

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Die Wechselwirkung antitumoraler
Metallkomplexe mit DNA:
Relevanz für die biologische Wirkung**

Stefanie Zorbas-Seifried

aus
Heidelberg

2007

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar von Herrn Prof. Dr. D. Oesterhelt betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am19.12.2006.....

.....
(Stefanie Zorbas-Seifried)

Dissertation eingereicht am19.12.2006.....
1. GutachterProf. Dr. D. Oesterhelt.....
2. GutachterProf. Dr. Dr. B. K. Keppler.....
Mündliche Prüfung am30.04.2007.....

***Wir sehen nie, was wir getan haben, wir können nur sehen,
was noch zu tun bleibt***

Marie Curie (1867 - 1934)

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Veröffentlichungen	3
Einleitung	4
1. Die Krebstherapie	4
2. Cisplatin	5
3. Aufnahme von Cisplatin in die Zelle und Adduktbildung mit der DNA	6
4. Strukturelle Folgen der DNA-Addukte	8
5. DNA-Schadenserkenkung und Modelle für die Zytotoxizität von Cisplatin	10
6. Signaltransduktionswege bei der Weiterleitung des Schadenssignals	13
7. Resistenzentwicklung unter Cisplatintherapie	15
8. Platinanaloge der nächsten Generationen: Neue Konzepte	16
Aufgabenstellung	20
Material und Methoden	22
<i>I. Häufig verwendete Puffer:</i>	22
<i>II. Allgemeine Methoden</i>	23
1. Gelelektrophoresen	23
1.1. Polyacrylamidgelelektrophorese, kontinuierlich, diskontinuierlich	23
1.2 Denaturierende Gele	23
2. Transformation von Plasmid in kompetente Bakterien und Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur	25
3. Isolierung der Plasmide dspTZ18u und P5 aus Bakterien	26
4. Reinigung und Konzentrierung von DNA	26
4.1 Ethanol-fällung zur Konzentrierung und Reinigung von Plasmid-DNA	26
4.2 Phenolextraktion	26
4.3 Reinigung der DNA von DNAsen	27
4.4 Fällung der DNA mit linearem Polyacrylamid	27
5. Darstellung des 177 bp DNA-Fragments über Restriktionsverdau	27
6. Radioaktive Markierungen	28
6. 1 Radioaktive 3'-Markierung mit Klenow-Polymerase	28
6. 2 Radioaktive 5'-Markierung mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	28
<i>III. Spezielle Methoden</i>	29
1. Analyse der globalen DNA-Sekundärstrukturveränderungen und der DNA-Modifikation	29
2. Bestimmung des DNA-Modifikationsgrads über ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)	30
3. Analyse der intermolekularen Quervernetzungen (QV)	31
4. T4 DNA-Polymerase-Kartierung	31
4.1. DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert	32
4.1.1 Herstellung der einseitig markierten Oligonukleotide bzw. des einseitig markierten 177bp DNA-Fragments für die Sequenzierung nach M.-G. und die T4 DNA-Polymerase-Kartierungsreaktion	32
4.1.2 Sequenzreaktionen	33
4.2 T4 DNA-Polymerase-Kartierung	34
5. Protein-DNA-Quervernetzung	35
5.1 Synthese der Bisamid-bisplatin(II)-Verbindung (ESS46)	35
5.2 Herstellung eines HeLa-Gesamtzell-Proteinextrakts nach Manley	38
5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration des HeLa-Gesamtzell-extrakts nach Bradford	40
5.3 Modifikation des 177 bp DNA-Fragments mit Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)	43
5.4 Protein-DNA-Quervernetzung	43
5.5 Silberfärbung eines 4% SDS-Polyacrylamidgels mit ansteigenden Mengen an HeLa-Gesamtzell-extrakt	44
5.6 Isolierung der Protein-DNA-Quervernetzung über Isopyknische Ultrazentrifugation	45
5.7 Isolierung des Protein-DNA-Komplexes über Bandenelution und nachfolgender Identifizierung des Proteins über Massenspektrometrie	46

Beschreibung einiger spezieller Methoden	50
1. Exkurs: DNA-Topologie [94-96].....	50
2. DNA-Sekundärstrukturveränderungen: DNA-Biegung und DNA-Aufdrillung	52
3. Bestimmung der intermolekularen Quervernetzungen	54
Ergebnisse und Diskussion	56
I. Konzept der Organspezifität („drug-targeting“): Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe	56
1. DNA-Sekundärstrukturveränderungen und Reaktivität gegenüber DNA	58
2. Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase: Prinzipien	62
2.1. Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, L2L1	63
2.2 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, L1L2	66
2.3 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Massentitration, L2L1	68
2.4 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, KMfw	71
2.5 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, 177 bp DNA-Fragment	74
3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	76
II. Konzept der „trans-Aktivierung“: Platinverbindungen mit Acetoxim- und Hydroxylaminliganden	80
1. DNA-Sekundärstrukturveränderungen und Reaktivität gegenüber DNA	83
2. Untersuchung der intermolekularen Quervernetzungen	86
3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	88
III: Umsetzung des „prodrug“ Prinzips: Platin(II)-Ringschluss-Komplexe	92
1. DNA-Sekundärstrukturveränderungen und Reaktivität gegenüber DNA	94
2. Analyse der intermolekularen Quervernetzungen	97
3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	100
IV. Umsetzung des „prodrug“ Prinzips mit alternativen Metallverbindungen: Ruthenium-Komplexe	104
1. Analyse der DNA-Sekundärstrukturveränderungen und der Einfluss von Reduktionsmitteln	106
2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	110
V: Die binukleare Verbindung Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)	114
Eigenschaften von ESS46 und Vorarbeiten	114
1. Synthese von Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)	116
2. Präparation des HeLa-Gesamtzell-Proteinextrakts	118
3. Optimierung der Bedingungen für die Protein-DNA-Quervernetzung	118
4. Versuch der Isolierung der Protein-DNA-Spezies durch isopyknische UZ	123
5. Isolierung des Protein-DNA-Komplexes über Bandenelution und nachfolgender Identifizierung des Proteins über Massenspektrometrie	125
6. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse	133
Zusammenfassung	138
Abkürzungen und chemische Bezeichnungen der Metallkomplexe	142
Literaturverzeichnis	146
Danksagung	154
Lebenslauf	156

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit sind in den folgenden Artikeln veröffentlicht:

Zorbas-Seifried, S., Hartinger, C. G., Meelich, K., Galanski, M., Keppler, B. K., and Zorbas, H. (2006) DNA Interactions of pH-Sensitive, Antitumor Bis(aminoalcohol) dichloroplatinum(II) Complexes. *Biochemistry* 45, 14817-14825.

Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M., Kukushkin, N., Groessl, M., Hartinger, C., Semenova, O., Zorbas, H., Kukushkin, V. Y., and Keppler, B. (2006) Reversion of structure-activity relationships of antitumor platinum complexes by acetoxime but not hydroxylamine ligands. *Mol Pharmacol*, Published online ahead of print on October 18, 2006 as doi:10.1124/mol.106.030726.

Hartinger, C. G., Zorbas-Seifried, S., Jakupec, M. A., Kynast, B., Zorbas, H., and Keppler, B. K. (2006) From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem* 100, 891-904.

Einleitung

1. Die Krebstherapie

Hippokrates von Kos (um 460 v. Chr.), der als Begründer der rational-empirischen Schulmedizin gilt, war vermutlich der erste der den Begriff „Krebs“ (*griech.: καρκίνος*) prägte. Ihm fiel die Ähnlichkeit eines Brustgeschwürs mit den Beinen eines Krustentiers auf. Noch heute bezeichnet der Begriff „Krebs“ einen bösartigen Tumor im Allgemeinen.

Trotz zahlreicher Therapiemöglichkeiten und neuen Erkenntnissen über diese Erkrankung sterben in den Industrieländern immer noch 25% der Bevölkerung aufgrund maligner Erkrankungen [1]. In den letzten Jahrzehnten wurden im Bereich der Krebstherapeutika zahlreiche Neuerungen eingeführt. Die modernsten Ansätze in der Behandlung repräsentieren die sog. „smart drugs“, hochspezifisch wirkende, niedermolekulare Verbindungen. Zu diesen zählen der Kinaseinhibitor Glivec® (Imatinib) [2] und der Tyrosinkinase- und Angiogeneseinhibitor Sutent® (Sunitinib), der erst Anfang dieses Jahres in Europa den „orphan drug“ Status für die Behandlung von fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen und nicht-rezesierbarer gastrointestinaler Stromatumoren ("GIST") erhalten hat [3]. Auch immunologische Therapien, z.B. mit Interferonen und monoklonalen Antikörpern (Rituxan®, Herzeptin®, Campath®) kommen zum Einsatz. Seit Juni 2006 steht in den USA zum ersten Mal ein Impfstoff (Gardasil®) gegen den durch humane Papillomaviren (HPV) verursachte Gebärmutterhalskrebs zur Verfügung [4]. Allerdings können viele der neuen Ansätze nur als Adjuvantien eingesetzt werden, oder wenn vorhergehende konventionelle Therapiemodelle nicht, oder nicht mehr ausreichend ansprechen. Aus diesen Gründen kann auf die klassischen Ansätze in der Krebstherapie nicht verzichtet werden. Zu diesen zählen die operative Entfernung des Tumors, Bestrahlungstherapie und die Therapie mit nicht sehr spezifisch wirkenden Chemotherapeutika, wie zytostatisch wirksamen Antibiotika (Anthracycline, Actinomycin D, Bleomycin) Alkylantien (Cyclophosphamid, Ifosfamid) Mitosehemmern (Vinkaalkaloide, Taxoide), Antimetaboliten (Methotrexat, 5-FU, Gemcitabin), Topoisomerasehemmern (Camptothecin, Etoposid, Topotecan) und Metallverbindungen wie Cisplatin.

2. Cisplatin

Cis-Diammindichloroplatin(II) (Abb. 1) zählt bis heute zu den erfolgreichsten Chemotherapeutika im Kampf gegen den Krebs. Der neutrale, anorganische, quadratisch planare Komplex mit Platin in der Oxidationsstufe II und Liganden in der *cis*-Konfiguration wurde bereits 1844 von M. Peyrone synthetisiert [5]. 1969 entdeckte Barnett Rosenberg seine antitumorale Eigenschaft [6]. Erste klinische Tests im Jahr 1971 durch J. M. Hill [7] zeigten die Wirksamkeit von Cisplatin bei malignen Lymphomen, Hodgkin's disease und weiteren Tumorarten.

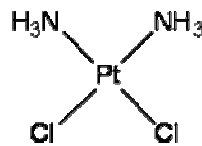


Abb. 1: Das Chemotherapeutikum Cisplatin.

Seit 1979 in der klinischen Anwendung wird Cisplatin neben anderen platinhaltigen Verbindungen in Monotherapie und in zahlreichen Kombinationstherapien mit Vertretern der Vincaalkaloide, Antibiotika, Topoisomerase II Hemmern, Alkylantien und Antimetaboliten gegen Ovarienkrebs, Hodenkrebs, kleinzelliges und nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom und andere Krebsarten eingesetzt [8-14]. Tabelle 1 soll einen kurzen Überblick über die verschiedenen Standardtherapien und deren Indikation vermitteln. Insbesondere bei Hodenkrebs kann eine Heilungsrate bis zu 90%, bei frühzeitigem Erkennen der Erkrankung sogar eine Rate von 100% erreicht werden [15].

Die Verabreichung von Cisplatin erfolgt intravenös in einer Dosis von 50-120 mg/m² Körperoberfläche alle 4 Wochen in Form einer Kurzinfusion für 6-8 h. Diese Therapie wird von zahlreichen, teilweise schwerwiegenden und damit dosislimitierenden Nebenwirkungen begleitet. Dazu zählen Nephrotoxizität, Granulozyto- und Thrombozytopenie, Ototoxizität und Übelkeit/Erbrechen. Nephrotoxizität kann jedoch weitgehend durch Hydratation und Diurese vermieden werden, gegen Übelkeit und Erbrechen hat sich der Einsatz von Serotonin-Rezeptorantagonisten, z.B. Ondansetron, bewährt [11]. Weitere Nachteile stellen aber das enge Wirkungsspektrum, sowie angeborene und erworbene Resistenzen dar. Eine große

Einschränkung für den Patienten ist die ausschließlich intravenöse Verabreichung, mit der immer ein stationärer Aufenthalt verbunden ist.

	...in Kombination mit			Art des Tumors
Cisplatin oder Carboplatin...	Topotecan			Ovarienkarzinom, kleinzelliger Lungenkrebs
	Etoposid			Lungenkrebs
	Etoposid	Bleomycin		Testiskarzinom (metastasierend)
	Etoposid		Ifosfamid	Ovarienkarzinom
			Cyclophosphamid	
		Epirubicin		
		Doxorubicin (Adriamycin)		
			Paclitaxel	
			Docetaxel	Lungenkrebs
	Pemetrexet			Mesotheliom (Asbesttumor)
	Methotrexat	Doxorubicin (Adriamycin)	Vinblastin	Blasenkarzinom (fortgeschritten/metastasierend)
	5-FU		50 Gy lokale Bestrahlung	Ösophaguskarzinom, palliative Radio-Chemotherapie
	5-FU, Gemcitabin	Epirubicin		Pankreaskrebs
	Gemcitabin			Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs

Topoisomerasehemmer	Antimetaboliten	Antibiotika	Alkylantien	Mitosehemmer
---------------------	-----------------	-------------	-------------	--------------

Tab. 1: Kombinationstherapien gegen verschiedene Krebsarten mit Cisplatin oder Carboplatin.

3. Aufnahme von Cisplatin in die Zelle und Adduktbildung mit der DNA

Nach der intravenösen Verabreichung liegt Cisplatin zu einem großen Teil an Plasmaproteine gebunden vor; nur ca. 1% der Verbindung gelangt schließlich in den Zellkern. Die Aufnahme in die Zelle erfolgt durch passive Diffusion [16-18], wobei in letzter Zeit auch eine erleichterte Diffusion, z. B. über den Kupfertransporter CTR1 diskutiert wird [19,20]. Im intrazellulären Raum erfolgt die Hydrolyse von Cisplatin, die durch eine niedrige Chloridionenkonzentration (4 mM) begünstigt wird. Die Hydrolyse im neutralen Milieu der Zelle findet in zwei Schritten statt, wobei im ersten der Monoaqua- und im zweiten der zweifach positiv geladene Diaquakomplex gebildet wird (Abb. 2) [21]. Da Wasser eine gute Abgangsgruppe in einer nukleophilen Substitution darstellt, kann dieser Komplex mit Nukleophilen der Zelle reagieren, bevorzugt mit dem nukleophilen Stickstoffatom 7 des Guanins in der DNA. Aber auch weitere Nukleophile der Zelle wie Thiolgruppen von Proteinen oder Stickstoffatome anderer DNA-Basen können reagieren.

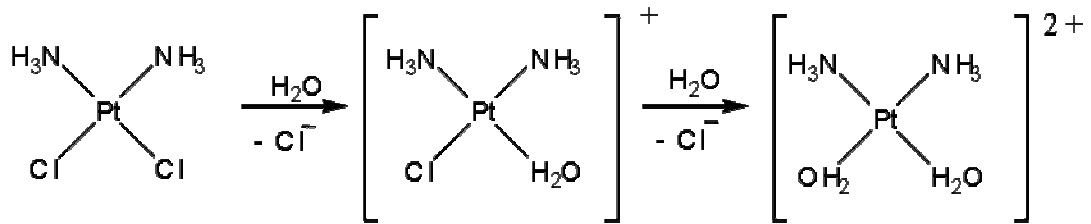


Abb. 2: Zweistufige Hydrolyse von Cisplatin

Durch diese Reaktion entstehen verschiedene Addukte mit der DNA (Abb. 3), die als allgemein akzeptierte biologische Zielstruktur von allen Platinverbindungen gilt [22,23]. Es entstehen zuerst monofunktionale Addukte, bei denen nur eine Platinvalenz mit der DNA reagiert [24], dann bifunktionale Addukte, bei denen beide Platinvalenzen mit der DNA reagieren. Die bifunktionalen Addukte werden in intramolekulare Quervernetzungen (QV) und intermolekulare QV unterteilt. Bei den intramolekularen QV werden 2 benachbarte Guanine (= 1,2-d(GpG)-intramolekulare QV, 65%) oder Guanine mit Adeninen (= 1,2-d(ApG)-intramolekulare QV, 20-25%) verknüpft. Zu den selteneren intramolekularen QV zählen die 1,3-intramolekulare QV zwischen zwei Guaninen bzw. einem Guanin und einem Adenin (= 1,3-d(GpXpG), 1,2-d(ApXpG)). Die intermolekulare QV verknüpft Guanine von gegenüberliegenden Strängen (= d(GC/GC)-intermolekulare QV, 2%) [24,25].

Wie kann man sich diese Sequenzspezifität von Cisplatin erklären? Rein statistisch dürften sich nur ca. 12,5% 1,2-d(GpG)-intramolekulare Quervernetzungen ausbilden [21]. Da aber benachbarte Guanine das größte negative elektrostatische Potential aufweisen, können die positiv geladenen Cisplatin-Aquakomplexe am stärksten angezogen werden [26]. Das zweithäufigste Addukt stellt die 1,2-d(ApG)-intramolekulare QV dar, wobei 1,2-d(GpA)-intramolekulare QV eher selten sind, obwohl beide Sequenzen etwa gleich häufig in der DNA vorkommen. Verantwortlich für diese Spezifität ist der fünffach koordinierte Übergangszustand bei der Reaktion von Cisplatin mit DNA. Dieser Übergangszustand wird von einem in 5'-Richtung gelegenen Adenin, in Bezug auf das platinierte Guanin, besser stabilisiert als von einem in 3'-Richtung gelegenen Adenin [27]. Im Falle der intermolekularen QV finden sich praktisch ausschließlich d(GC/GC)-Addukte und keine d(CG/CG)-Addukte. Als möglicher Grund wird der unterschiedliche Abstand der Guanine in einer B-DNA diskutiert. Für das d(GC/GC)-Addukt beträgt dieser 0,71 nm und für das d(CG/CG)-Addukt 0,89 nm. Dieser kürzere Abstand des ersten Addukts könnte

ausschlaggebend für die bevorzugte Reaktion der Guanine in dieser Sequenz sein [28].

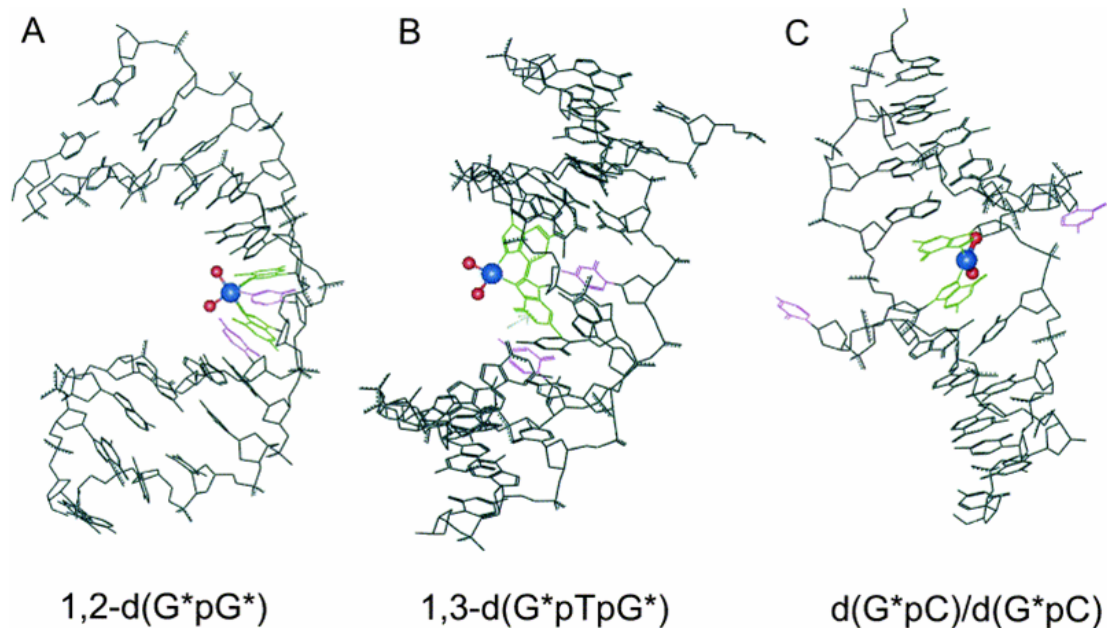


Abb. 3: Mögliche Addukte von Cisplatin () mit DNA [29].

4. Strukturelle Folgen der DNA-Addukte

Die ausgebildeten Addukte von Cisplatin und anderen Platin-Komplexen auf der DNA führen zu Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur, z.B. Aufdrillung, lokales Schmelzen und/oder Biegen [21]. Monofunktionale (und interkalierende) Addukte können die DNA aufwinden. Das Biegen der DNA kann durch intramolekulare Quervernetzungen [30,31], aber auch durch intermolekulare QV verursacht werden [32-36].

Die 1,2-intramolekulare QV stellt mit 65% das häufigste DNA-Addukt bei Cisplatin dar. Aufgrund ihrer Häufigkeit und den durch das Addukt hervorgerufenen Strukturveränderungen der DNA wird sie als eine für die Zytotoxizität verantwortliche Läsion betrachtet. Gelelektrophoretische, NMR- und Röntgenstrukturanalysen ergaben, dass alle Cisplatin-Quervernetzungen ein Biegen und eine Aufdrillung der DNA hervorrufen. Die Tabelle 2 soll einen kurzen Überblick über die Biegungs- und Aufdrillungswinkel der verschiedenen Cisplatin-Addukte geben, die durch die verschiedenen Methoden bestimmt wurden. Die NMR- und kristallografischen Untersuchungen ergaben außerdem, dass die 1,2-intramolekulare QV einen „roll“

zwischen den platinieren Purinbasen, eine Verschiebung des Platinatoms aus der Ebene der Purinringe, und eine rigide Biegung der Helixachse in Richtung der großen Furche der DNA verursacht. Zusätzlich kommt es zu einer Störung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem 5'-Guanin und dem komplementären Cytosin, einer Weitung und Abflachung der kleinen Furche gegenüber dem Cisplatin-Addukt, und einer globalen Verzerrung der DNA über 4-5 Basenpaare [22,37] (Abb. 3 A). Eine 1,3-intramolekulare QV wie z.B. 1,2-d(GpTpG) biegt die DNA-Achse in Richtung der großen Furche der DNA, wodurch die kleine Furche geweitet wird. Die Basenpaarung am 5'-platinieren Guanin und zwischen dem zentralen Basenpaar Thymin und Adenin wird aufgehoben. Das zentrale Thymin wird in die kleine Furche der DNA gedrängt und die DNA wird an dieser Stelle flexibler [38,39] (Abb. 3 B).

Intermolekulare Quervernetzungen von Cisplatin biegen die DNA in Richtung der kleinen Furche. Diese Verzerrungen führen dazu, dass das jeweilige komplementäre Cytosin extrahelikal steht, und damit nicht mehr mit dem jeweiligen platinieren Guanin basengepaart ist. Das platinieren Guanin rotiert um 180° (*syn*-Konformation) und befindet sich nun in der kleinen Furche der DNA (Abb. 3 C) [34-36].

Wie die Zytotoxizität aber mit der Ausbildung von bestimmten Strukturveränderungen der DNA genau korreliert, ist noch nicht abschließend geklärt.

Addukt	Biegung (°)	Aufdrillung (°)
1,2-d(GpG)-intramolekulare QV	32 ^G [40] 39/55 ^X [30,41] 78 ^N [42] 58 ^N [31]	13 ^G [43] 25 ^N [42] 21 ^N [31]
1,2-d(ApG)-intramolekulare QV	34 ^G [40] 55 ^N [44]	13 ^G [43]
1,3-d(GpXpG)-intramolekulare QV	35 ^G [45] 20 ^N [38,39]	23 ^G [43] 19 ^N [38,39]
d(GC/GC)-intermolekulare QV	45 ^G [45] 47 ^X [34] 20 ^N [36] 40 ^N [35]	70 ^G [45] 70 ^X [34] 87 ^N [36] 76 ^N [35]

Tab. 2: Zusammenfassung der Veränderungen der DNA-Struktur nach Anbindung von Cisplatin. (°) ermittelt über G = Gelelektrophorese; X = Röntgenstrukturanalyse; N = NMR-Analyse.

5. DNA-Schadenserkennung und Modelle für die Zytotoxizität von Cisplatin

Lange Zeit wurde die Inhibierung der DNA-Replikation durch sterische Hinderung der Replikationsmaschinerie als unmittelbarer Grund für die zytotoxischen Eigenschaften von Cisplatin angenommen. Es zeigte sich jedoch, dass reparaturdefiziente CHO-Zellen, die mit sehr niedrigen Cisplatinkonzentrationen behandelt wurden, einen Arrest in der G2-Phase des Zellzyklus zeigten und starben, obwohl es nicht zu einer Inhibierung der DNA-Replikation in der S-Phase kam. Auf der anderen Seite zeigten Zellen mit funktionsfähigem Reparatursystem, die mit höheren Cisplatinkonzentrationen behandelt wurden, eine Inhibierung der Replikation während der S-Phase, die Zellen aber überlebten. D.h., dass der durch Cisplatin hervorgerufene Zelltod nicht mit der Inhibierung der DNA-Replikation korreliert, und dass also die Inhibierung der DNA-Replikation allein nicht der Grund für den Zelltod durch Cisplatin sein kann [46]. Deshalb wurden weitere Modelle für die Zytotoxizität von Cisplatin gesucht.

Die Biegung der DNA, die durch die 1,2-intramolekulare Quervernetzung von Cisplatin hervorgerufen wird, kann von verschiedenen Proteinen der Zelle erkannt und gebunden werden (Abb. 4). Zu diesen Proteinen zählen z.B. die Proteine des Fehlpaarung-Reparatursystems („Mismatch Repair System“ = MMR) wie hMutS α , Proteine des Nukleotid-Exzisions-Reparatursystems („Nucleotide Excision Repair“ = NER), z.B. XPA, die Transkriptionsfaktoren hUBF („human Upstream Binding Factor“), und TBP („TATA Box Binding Protein“), und HMG („High Mobility Group“-Box Proteine [29].

Die Bindung dieser Proteine dient heute als Grundlage der Modellbildung für einen möglichen Zytotoxizitätsmechanismus von Cisplatin. HMG-Box Proteine, architektonische Chromatinproteine, können an die durch Cisplatin verursachte Biegung und Weitung der kleinen Furche der DNA binden. In vitro wurde gezeigt, dass durch die Bindung von HMGB1, Läsionen auf der DNA von Reparaturproteinen des NER-Systems abgeschirmt werden; NER ist für die Reparatur von Cisplatin 1,2-intramolekularen QV verantwortlich [47,48]. Durch diese Abschirmung kann das Addukt auf der DNA persistieren, was letztendlich über nicht vollständig verstandene Mechanismen zum Zelltod führt.

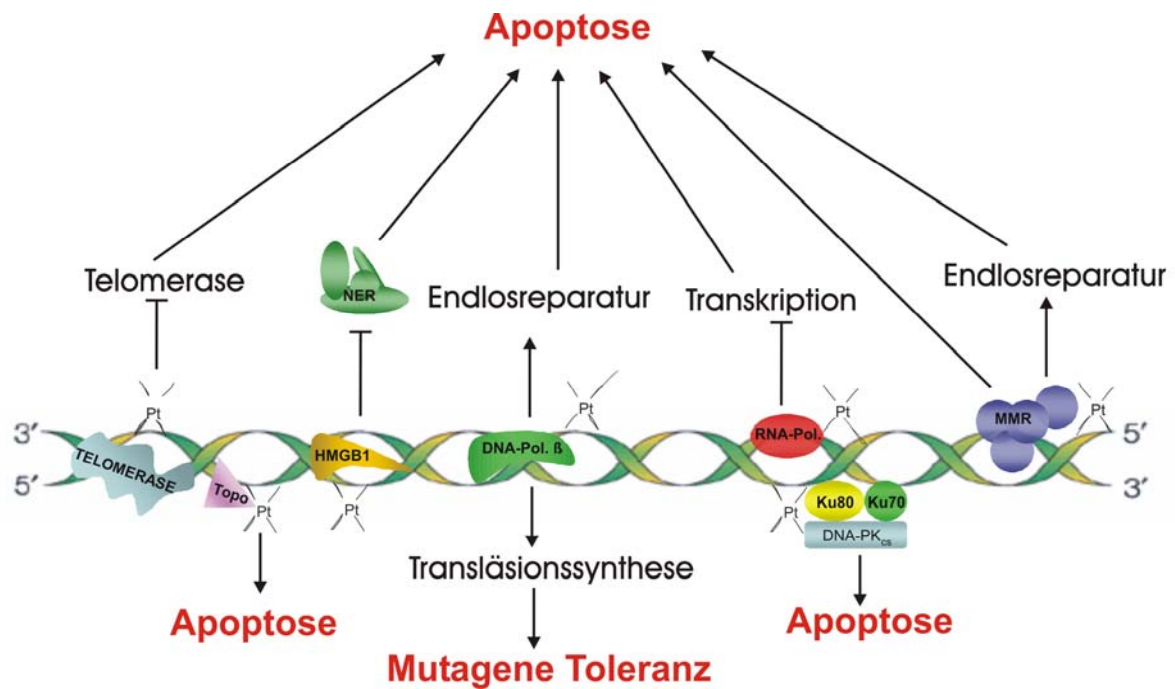


Abb. 4: Vereinfachte Darstellung der beteiligten Systeme an der DNA-Schadenserkennung.

In vivo Daten über die Beteiligung von HMG-Box-Proteinen an der antitumoralen Eigenschaft von Cisplatin sind aber widersprüchlich: Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von HMGB1 zu einer Sensitivierung von Brustkrebs- und Ovarienkrebszellen gegenüber Cisplatin führte [49]; das wäre konsistent mit einer Funktion von HMGB1, die die Zytotoxizität begünstigt, wie das Abschirmungsmodell postuliert. Auf der anderen Seite wurde aber beobachtet, dass cisplatinresistente Zelllinien oft erhöhte HMGB1-Spiegel aufweisen [50]. Dies zeigt, dass die Rolle von HMG-Proteinen bei der Vermittlung der Zytotoxizität von Cisplatin noch nicht vollständig geklärt und diese möglicherweise zellabhängig ist.

Ein weiteres Modell („Hijacking“-Modell) favorisiert die Möglichkeit, dass die gebunden Proteine von ihrem eigentlichen Wirkungsort ferngehalten werden, was zu einer Störung von fundamentalen Prozessen der Zelle führt.

Die Proteine hUBF und TBP sind an der Initiation der Transkription beteiligt. Durch die Erkennung von Cisplatin-Addukten auf der DNA werden sie vom Ort ihrer eigentlichen Wirkung ferngehalten [51]. Die resultierende Inhibierung der Transkription kann wiederum als Auslöser für die Weiterleitung von Schadenssignalen dienen und damit zum Zelltod führen.

Ein weiteres Modell, die Zytotoxizität von Cisplatin zu erklären, ist die Beteiligung des MMR-Systems an der Schadenserkennung [52,53]. In diesem Modell werden

verschiedene Möglichkeiten diskutiert: In der ersten entfernt das MMR-System gegenüber einem platinieren Guanin auf dem parentalen DNA-Strang das komplementäre Cytosin, welches aufgrund der DNA-Verzerrungen als Fehlpaarung erkannt wird. Da die eigentliche Schädigung, das Guanin-Cisplatin-Addukt, nicht entfernt wird, wird in der anschließenden Auffüllsynthese wiederum ein Cytosin (oder ein Thymin) eingebaut, das wiederholt aus- und eingebaut wird. So kommt es durch das Persistieren des Addukts auf der DNA zu sog. Endlosreparaturschleifen, die letztendlich zum Zelltod führen [22]. In der zweiten Möglichkeit führt die Bindung von Proteinen des MMR-Systems an das Cisplatin-Addukt zu *direkter* Weiterleitung eines Signals zum Zelltod [54].

Eine weitere Auswirkung von nicht reparierten Cisplatin-Addukten besteht darin, dass bestimmte DNA-Polymerasen, z.B. die DNA-Polymerase β , über die vorhandene Läsion auf der DNA hinweglesen können. Dabei wird gegenüber dem platinieren Guanin fälschlicher Weise oft ein Thymin statt eines Cytosins eingebaut. Dies kann, wie oben beschrieben, entweder zu einer Endlosreparatur mit nachfolgender Apoptose führen, oder aber die Fehlpaarung wird toleriert. Die Manifestation einer Mutation durch anschließende DNA-Replikation kann wiederum Ursache für das Auftreten von Sekundärtumoren sein, Tumoren, die also nach Ausheilung des Primärtumors an anderer Stelle auftreten (= mutagene Toleranz) [55].

Als weiterer Angriffspunkt für Cisplatin wird auch die Telomerase diskutiert, die die korrekte Replikation chromosomaler Enden durch anhängen von kurzen Wiederholungen sicherstellt. In somatischen Zellen, die keine Telomeraseaktivität aufweisen, ist jede Replikation von einem Verlust der Chromosomenenden begleitet, was letztendlich zur Seneszenz oder Apoptose führen soll. Es ist bekannt, dass in den meisten Tumorarten eine Telomeraseaktivität vorhanden ist, die die Unsterblichkeit der Tumorzellen durch die komplette Replikation des Chromosoms einschließlich der Enden sicherstellt [56,57]. In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Cisplatin die Telomeraseaktivität in Tumorzellen reduziert, so dass dieser Effekt einen wesentlichen Beitrag zur Zytotoxizität von Cisplatin haben könnte [58-60]. Es wird angenommen, dass Cisplatin-Addukte im guaninreichen Telomerbereich ausgebildet werden, und dadurch die Replikation der Telomerenden inhibiert wird [60]. Bis jetzt ist allerdings der Mechanismus dieser Hemmung unbekannt. Aber auch hier scheint die Grundvoraussetzung die Ausbildung persistierender Addukte auf der DNA zu sein.

Cisplatin-Addukte können auch die katalytische Aktivität der Topoisomerase I beeinflussen. In vitro Studien zeigten, dass Cisplatin-Addukte eine Inhibierung der Topoisomerase I durch Camptothecin verstärkten. Dies korrelierte mit einem synergistischen zytotoxischen Effekt von Cisplatin und dem Topoisomerase I Hemmer [61], was ein auch für die Cisplatintherapie interessantes Ergebnis darstellt. Eine der neuesten Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Cisplatin beschreibt die Schadenserkennung durch den Ku/DNA-abhängigen Proteinkinase Komplex. Dieser Komplex ist an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt, kann aber auch an DNA-Läsionen binden, wie sie z.B. durch Cisplatin verursacht werden. In diesem Zusammenhang wurde beobachtet, dass Zellen das Todessignal ausgelöst von der Kinase-Funktion des Komplexes zu Nachbarzellen weiterleiten konnten. Die Weitergabe des Signals erfolgte dabei durch „gap-junctions“, vorausgesetzt es bestand ein ausreichender Zellkontakt [62]. Der genaue Mechanismus dieser interessanten Beobachtung oder die Natur des Signals sind unbekannt.

6. Signaltransduktionswege bei der Weiterleitung des Schadenssignals

Wie soeben beschrieben, werden Cisplatin-Läsionen auf der DNA durch die verschiedensten Proteine erkannt, wobei eine Vielfalt an Systemen involviert ist. Die Signale, die auf die Schadenserkennung hin folgen, sind ebenso zahlreich. Bei Cisplatin assoziierten Signaltransduktionswegen spielen v.a. ATM („Ataxia Telangiectasia Mutated“), ATR („ATM- and Rad3-related“), c-ABL („cellular Abelson“), p53 und Proteine der MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) Kaskade eine zentrale Rolle [63]. Ihre letztendliche Beteiligung bei der Vermittlung der Zytotoxizität und die Kommunikation der Wege untereinander sind aber nicht abschließend geklärt. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über die mögliche Weiterleitung der Schadenssignale gegeben werden, der aber wegen der Fülle an Daten nicht erschöpfend behandelt werden kann. Abb. 5 zeigt zur Verdeutlichung einen schematischen Überblick der diskutierten Wege.

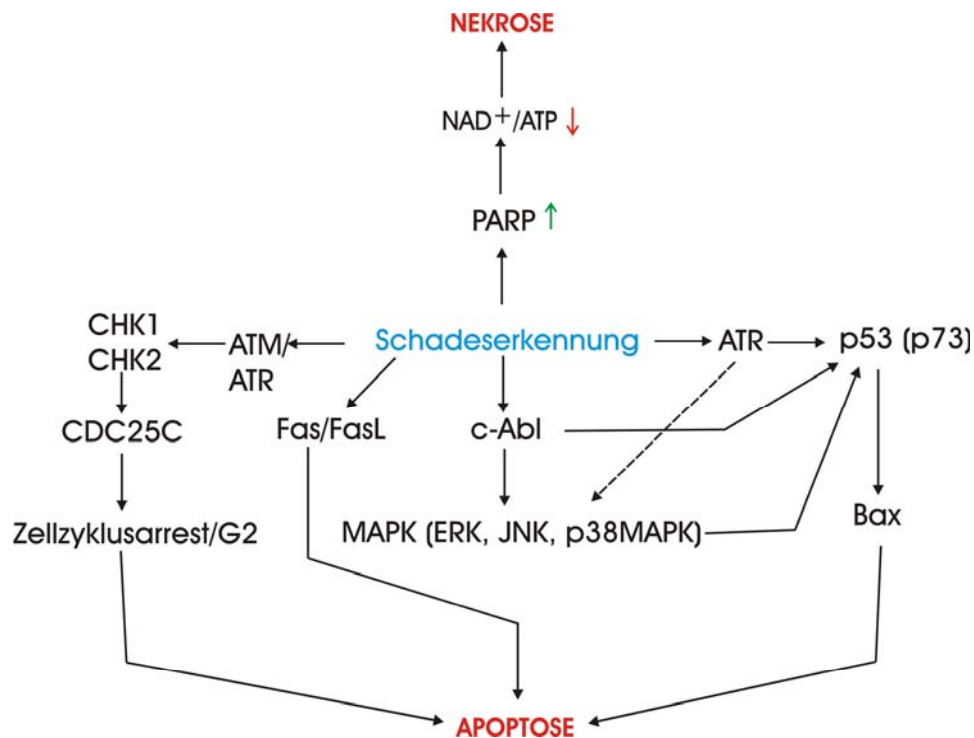


Abb. 5: Beteiligte Signaltransduktionswege nach der Schadenserkennung von Cisplatin-DNA-Addukten (Zusammenfassende Darstellung).

Eine Weiterleitung der Schadenserkennung auf der DNA kann durch die nukleare c-Abl-Tyrosinkinase erfolgen. Es wurde gezeigt, dass diese durch Cisplatin stimuliert werden kann [64]. Die Überexpression der c-Abl Tyrosinkinase in verschiedenen Zelllinien führte zu einer Aktivierung der Apoptose [65,66]. Dabei sind die Transkriptionsfaktoren p53 und das ähnliche p73 mögliche Effektoren von c-Abl [67], wobei p53 über den mitochondrialen Signalweg (Caspase-9-Caspase-3-Weg) und proapoptotisches Bax die Apoptose einleitet. Weitere Signalmoleküle können auch die Mitglieder der MAPK Familie sein, ERK („Extracellular signal Regulated Kinase“), JNK („Jun N-terminal Kinase“) und p38 MAPK [68-70], die wiederum zu einer Aktivierung von p53 und damit zum Zelltod führen können. Interessanterweise enthält c-Abl 3 HMG-ähnliche Strukturen, wobei eine direkte Erkennung des Cisplatin-Addukts durch diese Domänen noch nicht nachgewiesen wurde [71,72]. Auch die Kinase ATR kann durch Cisplatin aktiviert werden. p53 wird daraufhin von ATR phosphoryliert, wobei aber auch die direkte Aktivierung von Proteinen der MAPK Kaskade durch ATR diskutiert wird [73]. Auch der Zellzyklusarrest scheint eine Rolle bei der Zytotoxizitätsvermittlung zu spielen: Durch die Schadenserkennung auf der DNA können, wie gesagt, die Kinasen ATM und ATR

aktiviert werden, was wiederum zur Aktivierung der Kontrollpunkt-kinasen CHK1 und CHK2 führt. Die Phosphorylierung weiterer "abwärts"-Effektoren bedingt einen Zellzyklusarrest in der G2-Phase und kann damit, bei größerem Schaden der DNA, ein Signal zur Einleitung der Apoptose auslösen. Auch eine direkte Aktivierung von Fas/FasL durch die DNA-Schädigung wird diskutiert, wobei ein Signalweg angeschlossen ist, der nicht über die Mitochondrien zur Apoptose führt (Caspase-8-Caspase-3 Weg) [63]. Ein erst kürzlich erkannter Signalweg stellt die, durch starke DNA-Schädigung (bei sehr hohen Konzentrationen von Cisplatin), hervorgerufene Hyperaktivierung von PARP (Poly(ADP-ribose)polymerase) dar. Dies hat die Abreicherung von NAD⁺/ATP zur Folge, was letztendlich zur Nekrose der Zelle führt [74,75]. Somit wurde auch die Beteiligung dieses Zelltods an der Zytotoxizität von Cisplatin gezeigt.

7. Resistenzentwicklung unter Cisplatintherapie

Die Resistenz von Tumorzellen gegenüber Cisplatin stellt ein Problem in der Krebstherapie dar. Einige Tumore zeigen eine angeborene Resistenz, während andere Tumore erst während der Behandlung Resistenzen entwickeln. Die Gründe für Resistenzen sind vielfach und meist eine Mischung von z. B. einer geringen Akkumulation von Addukten auf der DNA, deren verstärkte Reparatur, einer erhöhten Toleranz der DNA-Schäden und damit verbundenen Veränderungen in Signalwegen, die das Überleben der Zelle regeln [76].

Die geringe Ausbildung von DNA-Addukten könnte durch eine verminderte Platinaufnahme, eine erhöhte Ausschleusung aus den Zellen oder durch eine Inaktivierung von Cisplatin durch schwefelhaltige Zellkomponenten erfolgen. Für eine verminderte Aufnahme von Cisplatin in Zellen wird auch der schon erwähnte Kupfertransporter CTR1 verantwortlich gemacht. Eine Deletion des ctr1 Gens in der Hefe führte zu einer verminderten Aufnahme von Cisplatin und einer Erhöhung der Cisplatinresistenz [19,77]. Für die erhöhte Ausschleusung von Cisplatin aus resistenten Zelllinien wird die Beteiligung der MDR (Multidrug Resistance) P-glycoprotein Pumpe [78], und von Proteinen der „Multidrug-resistance“ assoziierten Proteinfamilie (MRP) [79] diskutiert, die für den Export einer Vielzahl von Verbindungen und somit für ihre Inaktivierung verantwortlich sind.

Auch schwefelhaltige Moleküle können an der Resistenzentwicklung beteiligt sein. Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist mit Konzentrationen bis zu 10 mM eine weit verbreitete schwefelhaltige Verbindung in Zellen. Ein möglicher Resistenzmechanismus stellt die Inaktivierung von Cisplatin nach Reaktion mit GSH dar [80]. Es wurde gezeigt, dass cisplatinresistente Tumorzelllinien erhöhte GSH-Spiegel aufweisen, bzw. dass eine dauernde Behandlung von Zellen mit Cisplatin eine Erhöhung der GSH-Spiegel zur Folge hatte [81,82]. Auch für Metallothionein, ein cysteinreiches Protein, wurde eine Interaktion mit Cisplatin gezeigt. Auch hier ergaben sich Zusammenhänge zwischen einer Cisplatinresistenz und erhöhten Metallothioneinspiegeln [83].

Die Ausbildung von Resistenzen kann auch mit Veränderungen von Reparatursystemen der Zelle assoziiert sein. In resistenten Zelllinien wurde eine Erhöhung der Reparatur durch das NER-System (ein Hauptweg zur Entfernung von Cisplatinaddukten) beobachtet, was zu einer effizienteren Eliminierung der Addukte von der DNA führte [84].

8. Platinanaloga der nächsten Generationen: Neue Konzepte

Die letzten Kapitel haben gezeigt, mit welchen Problemen (intravenöse Verabreichung, begrenztes Wirkungsspektrum, angeborene und erworbene Resistenzen, Nebenwirkungen) die Therapie mit Cisplatin belastet ist. Aufgrund dieser Probleme ergeben sich verschiedene Anforderungen an neue Platinanaloga und -derivate, z.B. eine Verringerung der allgemeinen Toxizität bei zumindest gleicher Aktivität wie Cisplatin, keine Kreuzresistenzen, ein breiteres Wirkungsspektrum und eine orale Verfügbarkeit.

Die Umsetzung dieser Anforderungen versuchte man durch zahlreiche chemische Variationen von Cisplatin zu erreichen: Der Austausch der abgehenden Liganden (Chloro) mit weniger labilen Fluchtgruppen sollte zur Verminderung der Reaktivität und somit zu weniger Nebenwirkungen führen. Die Einführung von sterisch anspruchsvolleren bleibenden Liganden sollte zu einer veränderten Organospezifität und damit zu einem veränderten Wirkungsspektrum verhelfen. Außerdem sollten dadurch Kreuzresistenzen überwunden werden. Durch Variation der Oxidationsstufe von Pt(II) auf Pt(IV) sollten weniger aktive Verbindungen geschaffen werden, die eine orale Verabreichung ermöglichen.

Diese Anforderungen wurden teilweise von den bereits in der Klinik eingeführten Platinanaloga Carboplatin (Paraplatin®), Oxaliplatin (Eloxatin®), Nedaplatin und dem (während des Verfassens dieses Manuskripts) in klinischer Phase III befindlichen Satraplatin erfüllt [85] (Abb. 6).

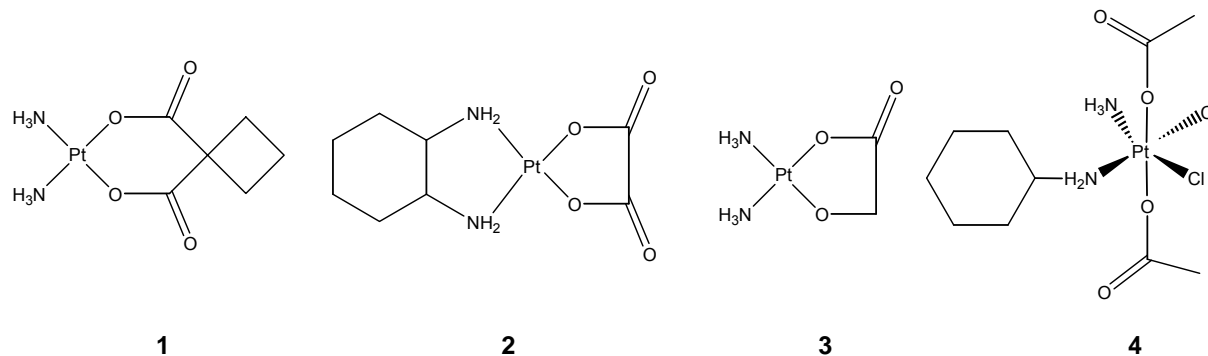


Abb. 6 : Carboplatin (1), Oxaliplatin (2), Nedaplatin (3) und Satraplatin (4).

Bei Carboplatin wurde durch die Einführung einer Cyclobutandicarboxylato-Fluchtgruppe eine geringere Reaktivität erreicht und damit eine geringere allgemeine Toxizität bei vergleichbarer Aktivität zu Cisplatin. Carboplatin hat ein identisches Wirkungsspektrum wie Cisplatin, kann aber wegen der herabgesetzten Reaktivität in höheren Dosierungen verabreicht werden [86]. Bei Standarddosierung kann eine Nephrotoxizität vermieden werden, allerdings stellt die Thrombozytopenie den dosislimitierenden Faktor bei der Therapie mit Carboplatin dar, und es zeigen sich weiterhin Kreuzresistenzen zu Cisplatin [85].

Durch die Verwendung der Fluchtgruppen Oxalat bzw. Glycolat konnte sowohl bei Oxaliplatin als auch bei Nedaplatin die Reaktivität und somit toxische Nebenreaktionen vermindert werden. Carboplatin und Nedaplatin unterscheiden sich nur in den Fluchtgruppen von Cisplatin und deshalb nicht von dessen Wirkungsspektrum. Bei Oxaliplatin wurden durch die Einführung eines sterisch besonders anspruchsvollen Diamincyclohexan-Rings (DACH) als bleibenden Liganden zusätzlich eine veränderte Organspezifität und eine Verringerung von Kreuzresistenzen erreicht. Oxaliplatin ist mittlerweile weltweit zugelassen und stellt in Kombination mit 5-Fluorouracil und Leukovorin die „first line“ Therapie bei metastasierendem kolorektalem Krebs dar [85]. Mit Oxaliplatin war somit das erste Chemotherapeutikum im Handel, dass auch bei Tumoren, die primär resistent gegenüber Cisplatin sind, wirksam ist [87]. Einen weiteren Fortschritt in der Chemotherapie stellte die Synthese von Satraplatin dar, einer oktahedrischen Verbindung, die Platin in der Oxidationsstufe IV enthält. Mit dieser Verbindung ist es

gelingen, ein oral verfügbares Platinanalogon zu synthetisieren, das außerdem erst am Wirkort seine volle Aktivität entfaltet („*prodrug*“ Prinzip). Es wird angenommen, dass Pt(IV) durch Agenzien im Blut oder in der Zelle zur aktiven Pt(II)-Verbindung reduziert werden kann. Erst die reduzierte Reaktivität und die erhöhte Lipophilie von Satraplatin (Resorption im Dünndarm) ermöglichte die orale Verabreichung [85,88]. Mit Satraplatin wäre die erste Platinverbindung auch bei hormonresistentem Prostatakrebs einsetzbar.

Eine ganz neue Synthesestrategie ergab sich, nachdem das jahrelange Paradigma, dass nur Verbindungen mit Liganden in der *cis*-Konfiguration antitumoral wirksam sind [89], durch die Synthese von zytotoxisch aktiven *trans*-Derivaten widerlegt wurde [90]. Mit diesen Komplexen konnte das Auftreten von Kreuzresistenzen gegenüber Cisplatin vermieden werden.

Neben Veränderungen der abgehenden und bleibenden Liganden, der Oxidationsstufe von Platin und die Änderung der Geometrie der Liganden gab es noch weitere Strategien, um das Spektrum antitumoral wirksamer Platinkomplexe zu erweitern, z.B. durch die Synthese *polynuklearer* Verbindungen. Zu dieser Gruppe zählt die trinukleare (3 Cisplatinreste) Verbindung BBR3464 (Abb. 7).

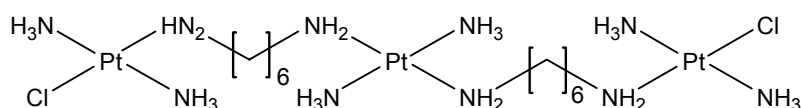


Abb.7: Der trinukleare Platinkomplex BBR3463.

Diese Verbindung zeigte in klinischen Studien eine erhöhte Zytotoxizität im Vergleich zu Cisplatin und Wirksamkeit in cisplatinresistenten Tumorzellen. Dies könnte an der unterschiedlichen Wechselwirkung mit der DNA liegen: BBR3464 kann weit auseinander liegende Basen sowohl auf dem gleichen wie auch auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang quervernetzen. Diese Art der Addukte werden nicht von mononuklearen Verbindungen wie Cisplatin ausgebildet, und sie könnten der Grund für die Wirksamkeit in resistenten Tumorzellen sein [91].

Einen weiteren Ansatz in der Chemotherapie stellt der Einsatz *alternativer Metallkomplexe* dar. Zu diesen zählen z.B. Gallium-, Lanthan-, Palladium, und Rutheniumverbindungen [88,92,93]. Mit diesen Komplexen sollte grundsätzlich das Einsatzspektrum von Metallkomplexen erweitert werden.

Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit orientierte sich an den in der Einleitung vorgestellten neuen Konzepten in der Krebstherapie mit Metallkomplexen. Für jedes dieser vorgestellten Konzepte wurden Vertreter unterschiedlicher Verbindungsklassen ausgewählt. Von diesen Vertretern sollte die Reaktivität gegenüber DNA, die DNA-Sekundärstrukturveränderungen und für einige Verbindungen die Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen mit der DNA bestimmt werden. Dabei sollten als Kontrollsubstanzen die parentalen Komplexe Cisplatin, Transplatin, oder Oxaliplatin je nach Fragestellung ebenfalls analysiert werden. Die dabei erhaltenen Daten sollten einen Einblick in die molekulare Wirkungsweise der Verbindungen geben und somit mögliche Erklärungen für ihre zytotoxische oder antitumorale Aktivität aufzeigen.

Zu den zu untersuchenden Platinkomplexen gehörten Vertreter der **Platin(II)-Biphosphonate**, die durch eine erhöhte Organspezifität zu einem verbesserten Therapieeffekt von Knochentumoren führen. Für diese Klasse sollte der Einfluss von Calcium auf die Art der gebildeten DNA-Addukte und die Reaktivität der Komplexe gegenüber DNA untersucht werden.

Die pH-abhängigen **Platin(II)-Ringschluss-Komplexe** stellen ein Konzept zur Umsetzung des „*prodrug*“ Prinzips dar. Aufgrund ihrer chemischen Struktur sollen sie ihre Wirkung vorwiegend im leicht sauren Milieu des Tumors entfalten. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die bekannte erhöhte Zytotoxizität der Verbindungen unter sauren Bedingungen auf eine erhöhte Reaktivität gegenüber DNA und auf eine erhöhte Adduktbildung mit der DNA zurückzuführen ist.

Um Kreuzresistenzen gegenüber Cisplatin zu bekämpfen, bedient man sich unter anderem der so genannten *trans*-Aktivierung. In dieser Arbeit sollten **cis/trans-Hydroxylamin-** und **-Acetoxim-Komplexe** untersucht werden, wobei erstere Vertreter der klassischen Struktur-Aktivitätsbeziehung repräsentieren (*cis* zytotoxischer als *trans*), das zweite Isomerenpaar aber ein aktives *trans*-Derivat beinhaltet. Anhand der DNA-Sekundärstrukturveränderungen, der DNA-Reaktivität und der Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen sollte gezeigt werden, ob diese Verbindungen auch in ihrer Wechselwirkung mit der DNA den jeweiligen Struktur-Aktivitätsbeziehungen entsprechen.

Für **Ruthenium-Komplexe**, die ein Beispiel für alternative Metallkomplexe sind und auch das „*prodrug*“ Prinzip repräsentieren, sollte der Einfluss von Reduktionsmitteln auf die Fähigkeit der Komplexe, Addukte mit der DNA zu bilden, untersucht werden.

Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit war die Neu-Synthese einer binuklearen Platinverbindung, **Bisamid-bisplatin(II)**, die die Verbindungsklasse der polynuklearen Platinkomplexe repräsentiert. DNA, die mit dieser Verbindung modifiziert ist, kann ein einziges Polypeptid aus einem HeLa-Gesamtzell-Proteinextrakt quervernetzen. Nach erfolgter Synthese der Bisamid-bisplatin(II)-Verbindung sollten die Quervernetzungsbedingungen verbessert werden. Unter optimierten Bedingungen sollte dann das an die DNA quervernetzte Protein isoliert und identifiziert werden.

In den jeweiligen Abschnitten werden die aufgelisteten Verbindungen kurz eingeführt und die Aufgabenstellung nochmals genau erläutert.

Material und Methoden

I. Häufig verwendete Puffer:

TBE Puffer pH 8,0:

90 mM	Tris
90 mM	Borsäure
2 mM	EDTA (pH 8,0)

TE Puffer pH 7,5:

10 mM	Tris/HCl
1 mM	EDTA (pH 8,0)

„Blue Juice“ Auftragspuffer

5,0%	Glycerol
0,5%	SDS
10 mM	EDTA
0,025%	Bromphenolblau
0,025%	Xylencyanol

SDS-Auftragspuffer mit DTT:

50 mM	Tris/HCl (pH 6,8)
100 mM	DTT (vor Gebrauch frisch zugegeben)
10%	Glycerol
2%	SDS
0,1%	Bromphenolblau
0,1%	Xylencyanol

Formamid-Auftragspuffer:

98%	Formamid (3x rekristallisiert)
10mM	EDTA (pH 8,0)
0,025%	Bromphenolblau
0,025%	Xylencyanol

Nativer Auftragspuffer:

5 %	Glycerol
0,025%	Bromphenolblau
0,025%	Xylencyanol

II. Allgemeine Methoden

1. Gelelektrophoresen

1.1. Polyacrylamidgel-Elektrophorese, kontinuierlich, diskontinuierlich

	natives 4% PAA-Gel	4% SDS PAA-Gel	10% SDS PAA-Gel	SDS-DISK-PAGE	
				Sammelgel 4%	Trenngel 10%
1 M Tris/HCl pH 6,8 [ml]	-	-	-	0,94	-
1 M Tris/HCl pH 8,8 [ml]	-	-	-	-	2,89
30%AA/Bis(30:0,8) [ml]	1	1	2,5	1	2,5
SDS 10% [µl]	-	75	75	75	75
APS 10% [µl]	60	60	60	30	30
TEMED [µl]	20	20	20	20	20
EDTA 0,5 M [µl]	-	-	-	37,5	37,5
10XTBE [ml]	0,75	0,75	0,75	-	-
Gesamtvolumen [ml]	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Laufpuffer	1x TBE,	1xTBE + 0,1% SDS,	1xTBE + 0,1% SDS,	25 mM Tris + 125 mM Glycin + 0,1%SDS	

1.2 Denaturierende Gele

Denaturierendes Harnstoffgel

Harnstoff	3,15 g
10XTBE	0,75 ml
30% AA/Bis (30:0,8)	1,00 ml
10% APS	75 µl
TEMED	10 µl
dd Wasser	ad 7,5 ml

Harnstoff wurde in Wasser, 10XTBE, 30% AA/Bis unter schwachen Erwärmen gelöst und kühl aufbewahrt. Nach Erkalten der Mischung wurden 10% APS und TEMED

dazugeben und mit Wasser auf 7,5 ml aufgefüllt. Der Vorlauf erfolgte 1 h bei 100 V, 1XTBE, der Hauptlauf bei 15 V/cm in 1XTBE für 1 h.

Denaturierendes DISK-Harnstoffgel

	<u>Sammelgel:</u>	<u>Trenngel:</u>
Harnstoff	1,6 g	3,2 g
30% AA/Bis (30:0,8)	0,5 ml	1,0 ml
1 M Tris/HCl pH 6,8	0,47 ml	1 M Tris/HCl pH 8,8 2,9 ml
10% APS	20 µl	40 µl
TEMED	5,0 µl	10 µl
dd Wasser	ad 3,75 ml	ad 7,5 ml

Harnstoff wurde in Wasser, 30% AA/Bis und 1 M Tris/HCl pH 6,8 für das Sammelgel und 1 M Tris/HCl pH 8,8 für das Trenngel unter schwachem Erwärmen gelöst und kühl aufbewahrt. Nach Erkalten der Mischung wurden 10% APS und TEMED dazugeben und mit Wasser auf 3,75 ml bzw. 7,5 ml aufgefüllt. Zuerst wurde das Trenngel, dann das Sammelgel gegossen.

Der Gellauf erfolgte in 25 mM Tris/HCl und 125 mM Glycin für 1,5 h bei 10 V/cm.

Denaturierendes Agarosegel

Zur Herstellung denaturierender 2% Agarosegele wurde Agarose in Wasser aufgekocht und anschließend mit 30 mM NaOH und 2 mM EDTA, pH 8,0 versetzt.

Der Gellauf erfolgte in 30 mM NaOH, 2 mM EDTA pH 8,0 bei 3 V/cm ÜN.

Auftragungspuffer :

50 mM NaOH

2,5% Ficoll 400

2 mM EDTA

0,025% Bromcresolgrün

Sequenzgele

Vorbehandlung der Platten:

Die Platten wurden nacheinander mit 0,5% SDS, 0,1 N NaOH und Wasser gründlich gewaschen und mit Ethanol trockengerieben. Die Thermostatierplatte wurde je dreimal mit „Plus One Repel Silane“ (Amersham Bioscience[®]) behandelt, getrocknet und abschließend mit einem fuselfreiem Tuch poliert. Die Glasplatte wurde zweimal mit einer Mischung aus 5 ml Ethanol, 187 µl 10% Essigsäure und 18,7 µl „Binde-Silan“ (LKB, Bromma) und einmal mit Ethanol behandelt. Das 12% Sequenzgel wurde auf einem Gelgießstand von Pharmacia gegossen.

Harnstoff	31,5 g
40% AA/Bis (19:1)	22,5 ml
10XTBE	3,75 ml
10%APS	750 µl
TEMED	30 µl
dd Wasser ad	75 ml

Harnstoff wurde in Wasser, 10XTBE, 40% AA/Bis (19:1) unter schwachen Erwärmen gelöst und kühl aufbewahrt. Nach Erkalten der Mischung wurden 10% APS und TEMED dazugeben und mit Wasser auf 75 ml aufgefüllt.

Der Vorlauf erfolgte bei 20 mA (limitierend), 0,5XTBE für ca. 1 h. Nach dem Hauptlauf wurde das Gel für 30 Minuten in 10% Essigsäure fixiert, für 2 h bei 45°C getrocknet, mit Folie abgedeckt und ÜN oder für 2 Tage exponiert.

2. Transformation von Plasmid in kompetente Bakterien und Vermehrung von Bakterien in Flüssigkultur

300 µl kompetente DH5-α E. coli Zellen (Invitrogen[®]) wurden mit einer Lösung, bestehend aus 1,2 M NaCl und 0,06 M MgCl₂, versetzt. Zu dieser Mischung wurden 0,5 µg Plasmid dspTZ18u oder Plasmid P5 hinzugefügt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C und Inkubation auf Eis für 3 Minuten. Zu diesem Ansatz wurden 200 µl LB-Medium ohne Antibiotikum hinzugefügt und für 60 Minuten bei 37°C und 900 rpm geschüttelt. Die Lösung wurde in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten mit Ampicillin (100

µg/ml)) ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Zur Vermehrung der Bakterien in Flüssigkultur wurde eine Bakterienkolonie einer Agarplatte in 100 ml LB Medium (100 µg/ml Ampicillin) überimpft und ÜN bei 37°C/250 rpm geschüttelt. Diese Vorkultur wurde 1:25 verdünnt und die Hauptkultur bis zur gewünscht OD₆₀₀ bei 37°C/250 rpm inkubiert. Die Stammhaltung der transformierten Bakterien erfolgte in Stichagar und als Glycerinstock.

Stichagar:

Bakterien wurden von einer Agarplatte, oder einer ÜN Kultur mit einem autoklavierten Zahnstocher in Stichagar überführt, der ÜN bei 37°C inkubiert wurde. Die Aufbewahrung der Behälter erfolgte dicht verschlossen bei 4°C.

Glycerinstock:

Zu gleichen Teilen ÜN Kultur wurde autoklaviertes Glycerin 87% gegeben und bei -80°C aufbewahrt.

3. Isolierung der Plasmide dspTZ18u und P5 aus Bakterien

Die Isolierung der Plasmide dspTZ18u und P5 erfolgte nach einem Qiagen® Standardprotokoll: Qiagen® Plasmid Mega Kit mit Qiagen® -tip 2500 für dspTZ18u, und Qiagen® Plasmid Midi Kit mit Qiagen® tip 500 für Plasmid P5.

4. Reinigung und Konzentrierung von DNA

4.1 Ethanolfällung zur Konzentrierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Eine Plasmidlösung wurde mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat-Lösung pH 5,2 und mit dem 2,5 fachen Volumen an 100% Ethanol versetzt. Nach 30 Minuten bei -80°C wurde für 15 Minuten bei 14000 g und RT zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in einem entsprechenden Volumen an 1XTE Puffer aufgenommen.

4.2 Phenolextraktion

Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an Rotiphenol® versetzt und gut gemischt. Nach Zentrifugation für 10 Sekunden bei 10000 g wurde Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) im gleichen Volumen zugegeben und für 5 Minuten

bei 14000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige, DNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und für 3 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde entnommen und eine Ethanol-fällung (s. 4.1) durchgeführt.

4.3 Reinigung der DNA von DNAsen

Nach Ethanol-fällung der Plasmide dspTZ18u und P5 wurde das DNA-Pellet in 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8,0 und 5 mM EGTA pH 8,0 gelöst und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µg/ml Proteinase K erfolgt eine Inkubation bei 50°C für 30 Minuten. Nach Phenolextraktion und Fällung der DNA wurde das DNA-Pellet in 1XTE Puffer gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

4.4 Fällung der DNA mit linearem Polyacrylamid

Zur Fällung geringer DNA-Mengen (< 10 µg/ml) wurde lineares Polyacrylamid hergestellt: Zu einer 5% Acrylamidlösung in 40 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8,0 wurde 0,1 % APS gegeben. Nach Zugabe von 1/1000 Volumen TEMED erfolgte für ca. 30 Minuten bei RT die Polymerisation. Dem Polymer wurde das 2,5 fache Volumen an Ethanol zugesetzt, zentrifugiert (15 Minuten/14000 g) und das Pellet in 1XTE Puffer aufgenommen, so dass sich eine Konzentration von 5 mg/ml linearem Polyacrylamid ergab. Um geringe DNA-Mengen zu fällen wurde eine klassische Ethanol-fällung in Anwesenheit von 75 µg/ml linearem PAA durchgeführt.

5. Darstellung des 177 bp DNA-Fragments über Restriktionsverdau

Das Plasmid P5 wurde im ersten Schritt durch das Restriktionsenzym PvuII (New England Biolabs®) geschnitten für das 2 Schnittstellen im Plasmid vorhanden sind. Hierfür wurden 60 µg Plasmid P5, 50 µl NE-Puffer 2 (New England Biolabs®), 30 µl PvuII (10 U/µl) in einem Endvolumen von 500 µl 3 h bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte durch Erhitzen für 10 Minuten bei 60°C. Aus dieser Spaltung resultierten zwei DNA-Fragmente mit einer Größe von 2514 bp und 502 bp. Die zweite Spaltung erfolgte mit 15 µL EcoRI (20 U/µL) (New England Biolabs®). Der Reaktionsmischung wurde für eine optimale Funktion des Enzyms 52 µl 1 M Tris/HCl pH 7,9 zugegeben. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei 37°C. Das Enzym EcoRI spaltet das DNA-Fragment mit 502 bp in ein 177 bp und ein 325 bp

DNA-Fragment. Die Analyse erfolgte in einem 1% Agarosegel mit 1XTBE Puffer für 1,5 h bei 10 V/cm. Das erhaltende 177 bp DNA-Fragment wurde aus einem präparativen 1% Agarosegel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA nach einem Standardprotokoll von Qiagen[®] (Qiaquick[®] Gel Extraction Kit) aus dem Gel eluiert. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte in 0,1XTE Puffer. Die Bestimmung der Konzentration der DNA erfolgte über die optische Dichte bei 260 nm.

6. Radioaktive Markierungen

6. 1 Radioaktive 3'-Markierung mit Klenow-Polymerase

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) am 3'-Ende radioaktiv markiert werden. Die Markierung erfolgt entweder durch direkten Einbau eines radioaktiven Nukleotids bei DNA-Fragmenten mit überhängenden 5'-Enden (Polymerasefunktion des Klenow-Fragments), oder durch vorherigen Ausbau eines oder mehrerer Nukleotide (3'→5' exonukleolytische Funktion des Klenow-Fragments) mit nachfolgendem Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids.

1-5 pmol DNA (177 bp ds DNA-Fragment) wurden in Anwesenheit von Ecopol Puffer (New England Biolabs[®]), 30 µCi α-³²P-dATP (3000 Ci/mmol, GE-Healthcare[®]), 5 Units Klenow-Polymerase (New England Biolabs[®]) in einem Endvolumen von 60 µl 15 Minuten bei RT inkubiert. Bei überhängenden 5'-Enden wurde der Reaktionsmischung je 50 µM dCTP, dGTP und dTTP zugefügt. Die Polymerase wurde durch Zugabe von 200 mM EDTA pH 8,0 und Erhitzen für 10 Minuten bei 65°C inaktiviert. Nicht eingebaute Nukleotide und Salze wurden über Nick Columns G50 (GE-Healthcare[®]), die vorher mit 0,1xTE equilibriert wurden, abgetrennt und die Effizienz der Markierung über Szintillationsmessung bestimmt.

6. 2 Radioaktive 5'-Markierung mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)

Diese Art der Markierung wurde zur radioaktiven Endmarkierung von DNA-Markern (GeneRuler[®] 50 bp DNA ladder, GeneRuler[®] 100 bp plus DNA ladder (Fermentas[®])), einzelsträngigen Oligonukleotiden und zur eindeutigen Markierung von einseitig 5'-phosphorylierten dsDNA-Fragmenten angewendet. Unter den gewählten

Bedingungen wird von γ - ^{32}P -ATP die radioaktive Phosphatgruppe auf das 5'-Hydroxylende der DNA übertragen.

1 μg DNA Marker oder 5-15 pmol einzelsträngige bzw. doppelsträngige DNA wurden mit T4-PNK Puffer (New England Biolabs[®]), 10 Units T4-PNK (1 U/ μl , New England Biolabs[®]) und 25 μCi γ - ^{32}P -ATP (3000 Ci/mmol, GE-Healthcare[®]) in einem Endvolumen von 25 μl für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 200 mM EDTA pH 8,0 gestoppt und die Reaktionsmischung über eine Nick Column G50 (1xTE) entsalzt. Die Effizienz der Markierung wurde durch Szintillationsmessung bestimmt.

III. Spezielle Methoden

1. Analyse der globalen DNA-Sekundärstrukturveränderungen und der DNA-Modifikation

Für die Untersuchung der Strukturveränderungen der DNA und des DNA-Modifikationsgrads wurden pro Inkubationszeitpunkt 1 μg Plasmid dspTZ18u und bei einigen Analysen 1,6 fmol eines radioaktiv markierten 177 bp DNA-Fragments mit 60 μM der zu untersuchenden Platin- oder Rutheniumverbindung in 0,1xTE Puffer oder 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. pH 6,0 in einem Gesamtvolumen von 40 μl bei 37°C inkubiert. Je nach Verbindung und Fragestellung variierte die Inkubationsdauer zwischen 1 Minute und 7 Stunden. Für Massentitrationsen wurde die Inkubationsmischung wie oben beschrieben hergestellt und mit ansteigenden Mengen an Platinverbindung versetzt. Die Inkubationsdauer und die Mengen an eingesetzter Metallverbindung bei der Massentitration variierten je nach Fragestellung. Für die Analyse der DNA-Sekundärstrukturveränderungen wurden nach der Inkubation sofort 20 μl des Reaktionsansatzes entnommen, zu 5 μl 5x „Blue Juice“ Auftragspuffer gegeben und die Proben in einem 1% Agarosegel/0,1XTBE bei 3 V/cm ÜN aufgetrennt. Das Gel wurde mit 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidiumbromid in 1XTBE gefärbt, unter UV visualisiert und mit einem Gel-Dokumentationssystem von Vilber Lourmat fotografiert.

Zur Visualisierung des DNA-Modifikationsgrads wurden jeweils 10 μl Aliquote der oben beschriebenen Inkubationsmischung entnommen und mit 2,5 μl 5x „Blue Juice“ Auftragspuffer gemischt. Die Proben wurden in einem 4 % SDS-

Polyacrylamidgel/0,1XTBE/0,1% SDS bei 15 V/cm für 1 h analysiert. Nach der Elektrophorese wurden die Gele in einer Mischung aus 7% Essigsäure und 4% Glycerin für 20 Min. fixiert und für ca. 1,5 h bei 65°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition der Gele erfolgte ÜN bei -80°C.

Je nach Fragestellung konnte den Ansätzen für die Bestimmung der DNA-Sekundärstrukturen und des DNA-Modifikationsgrads Glutathion, Ascorbinsäure und Calciumsalze zugesetzt werden. Für Die Untersuchung der Rutheniumverbindungen KP1019 und KP418 wurden einige der beschriebenen Versuche unter Argonatmosphäre und Lichtausschluss durchgeführt. Dazu wurden die Reaktionsmischungen und alle verwendeten Lösungen ca. 1 Minute mit Argon begast, bzw. alle Reaktionsgefäße mit Alufolie umwickelt.

2. Bestimmung des DNA-Modifikationsgrads über ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)

Zur Quantifizierung der DNA-Platinierung wurde für jeden Inkubationszeitpunkt 4 µg Plasmid und 60 µM der jeweiligen Verbindung in einem Endvolumen von 160 µl 0,1XTE, oder 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 6,0 bei 37°C für 1 bis 7 h inkubiert. Für Massentitrationsen variierte die Menge an Platinverbindung und die Inkubationsdauer je nach Fragestellung. Von jeder Probe wurde ein Aliquot von 20 µl entnommen, sofort mit 5 µl 5x „Blue Juice“ Auftragspuffer versetzt, und zur Reproduktion der DNA-Sekundärstrukturveränderungen die Reaktionsprodukte in einem 1% Agarosegel/1XTBE ÜN aufgetrennt. Zu den verbleibenden 140 µl wurde zur Abstopfung der Reaktion NaCl (Endkonzentration = 250 mM) gegeben. Die Fällung der platinieren DNA erfolgte mit 2,5 vol. Ethanol in Anwesenheit von 75 µg/ml linearem Polyacrylamid (s. Punkt I.4.4). Die Menge des gebundenen Platins wurde mittels ICP-MS ermittelt (Agilent 7500ce[®]; ausgestattet mit einem CETAC ASX-520 „autosampler“, und einem MicroMist Vernebler; Software: Agilent ICP-MS Chemstation B.03.02, Microsoft Excel 2003 SP2). Das DNA-Pellet wurde in 1 ml 2% HCl (HCl p.a. von Sigma Aldrich, weiter gereinigt mit einem „ quartz sub-boiling“ System von Milestone-MLS GmbH) gelöst und 200 µl jeder Probe mit 2% HCl auf 9 ml aufgefüllt. Für den internen Standard wurde 1 ml einer 10 ppb Indiumlösung zugegeben (CPI International). Gemäß der Richtlinien nach DIN 32645 wurden folgende Grenzen für die Detektion bzw. Quantifizierung gemessen: 34 ng/l (r_B

0,0008) und 86 ng/l (r_B 0,002). Die Versuche zu r_B -Wert Bestimmung wurden für jeden Zeitpunkt zweimal durchgeführt, wobei die Messung für jeden Zeitpunkt 10-mal erfolgte. Die r_B -Werte wurden wie folgt berechnet:

$$\frac{\frac{\text{Masse (Pt) [g/l]}}{M(\text{Pt) [g/mol]}}}{\frac{\text{Masse (Nukleotide) [g/l]}}{M (\text{Nukleotide) [g/mol]}}}$$

3. Analyse der intermolekularen Quervernetzungen (QV)

Zur Bestimmung der intermolekularen QV wurden 0,8 fmol radioaktiv markiertes 177 bp DNA-Fragment mit 60 μ M Platinverbindung in einem Endvolumen von 20 μ l 0,1XTE oder 10 mM Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 6,0 bei 37°C inkubiert. Für jeden Inkubationszeitpunkt wurde ein Ansatz bereitet und nach Inkubation sofort in der SpeedVac bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 10 μ l Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Nach Kochen für 3 Min. bei 95°C wurden die Proben in Eis abgeschreckt und in einem 4% Polyacrylamidgel, 7 M Harnstoff, 1XTBE bei 10 V/cm für 1 h analysiert. Nach Fixierung des Gels in einer Mischung aus 7% Essigsäure und 4% Glycerin wurde das Gel für ca. 1,5 h bei 65°C unter Vakuum getrocknet. Die Exposition der Gele erfolgte ÜN bei -80°C. Alternativ wurden die Proben auf einem denaturierenden Agarosegel, oder auf einem diskontinuierlichen Harnstoff-Polyacrylamidgel analysiert.

4. T4 DNA-Polymerase-Kartierung

Die T4 DNA-Polymerase-Kartierungstechnik dient zur Analyse der Modifikationsstellen von Metallkomplexen auf der DNA. Für die Auswertung dieser Kartierung muss die verwendete DNA nach Maxam-Gilbert sequenziert werden. Die erhaltene Sequenz dient als Referenzleiter für die T4-Polymerase-Kartierung.

4.1. DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert

4.1.1 Herstellung der einseitig markierten Oligonukleotide bzw. des einseitig markierten 177 bp DNA-Fragments für die Sequenzierung nach M.-G. und die T4 DNA-Polymerase-Kartierungsreaktion

Die M.-G. Reaktion und die T4-Polymerase-Kartierung benötigen eindeutig einseitig radioaktiv markierte DNA. Zur Darstellung einseitig markierter Oligonukleotide wurden 10 pmol des entsprechenden einzelsträngigen Oligonukleotids mit T4-PNK, wie unter Punkt II.6.2 beschrieben, markiert. Das radioaktive Oligonukleotid wurde anschließend mit dem nicht markierten komplementären Gegenstrang „annealt“. Hierfür wurden 10 pmol radioaktiv markierter Einzelstrang mit 50 pmol Gegenstrang unter Zufügung von 50 mM NaCl gemischt und für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Um ein zu schnelles abkühlen zu vermeiden, wurde der Ansatz im Heizblock belassen, dieser abgestellt und die Probe bis auf ca. 20°C abgekühlt.

Für die eindeutige radioaktive Markierung eines 177 bp DNA-Fragment wurde dieses Fragment über eine PCR generiert, bei der nur einer der beiden primer am 5'-Ende phosphoryliert war. Als Matrize diente das Plasmid P5. Für die PCR-Reaktion (Applied Biosystems, GeneAmp®, PCR System 9700) wurde folgender Ansatz verwendet:

Plasmid P5 (0,5 µg/µl)	0,5 µl
fw primer (0,1 nmol/µl)	1,0 µl
rev primer, phos (0,1 nmol/µl)	1,0 µl
dATP 10 mM	1,0 µl
dCTP 10 mM	1,0 µl
dGTP 10 mM	1,0 µl
dTTP 10 mM	1,0 µl
Ventpolymerase (2U/µl, NEB®)	1,0 µl
10X Thermopolpuffer (NEB®)	5,0 µl
dd Wasser	37,5 µl

Dieser Ansatz wurde 10-mal hergestellt und eine PCR mit folgendem Ablauf durchgeführt:

- 1) 96°C, 20 Sekunden
- 2) 96°C, 20 Sek.

3) 50°C, 50 Sek.

4) 72°C, 30 Sek.

Zyklus 2)-4) wiederholte sich 33-mal.

Die Reaktionsmischung wurde auf einem 1% Agarosegel mit 1X TBE Puffer bei 10 V/cm für 1,5 h aufgetrennt. Das Gel wurde mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid in 1XTBE für ca. 30 Minuten gefärbt, unter UV visualisiert und mit einem Gel-Dokumentationssystem von Vilber Lourmat fotografiert.

Das erhaltende 177 bp DNA-Fragment, das nun einseitig 5' phosphoryliert war, wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene DNA nach einem Standardprotokoll von Qiagen® (Qiaquick® Gel Extraction Kit) aus dem Gel eluiert. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte in 0,1XTE Puffer und die Bestimmung der Konzentration über die optische Dichte bei 260 nm. Die einseitig radioaktive Markierung wurde wie unter Punkt II.6.2 beschrieben durchgeführt, und die Markierungseffizienz über Szintillationsmessung berechnet.

4.1.2 Sequenzreaktionen

Die chemische DNA-Sequenzierung nach Maxam-Gilbert beruht auf der Modifikation der DNA-Basen mit spezifischen Reagenzien und der anschließenden alkalischen Abspaltung der modifizierten Basen mit Piperidin. Im Folgenden werden tabellarisch die verwendeten Reaktionen für Guanine, Cytosine, Pyrimidine und Purine aufgeführt. Alle verwendeten Reagenzien wurden von Merck® (Oligonukleotid Sequenzanalyse nach Maxam-Gilbert) verwendet.

	G	Pu (A+G)	Py (T+C)	C
1. einseitig radioaktiv markierte DNA im angegebenen Verhältnis	1	2	2	1
2. + Carrier DNA (0,7 µg/µl) in µl	5	10	10	5
3. + Puffer	200 µl DMS-Puffer	10 µl H ₂ O	10 µl H ₂ O	15 µl 5 M NaCl
4. + Reaktant	1 µl DMS	50 µl Ameisensäure	30 µl Hydrazin	30 µl Hydrazin
Inkubationszeit (Min.) bei 20°C	8	8	14	14
5. + Stopp Reagenz	50 µl G-Stopp	200 µl ACT-Stopp	200 µl ACT-Stopp	200 µl ACT-Stopp

Nach der Stoppreaktion wurde jeder Reaktion 1 ml Ethanol zugefügt und die DNA für 15 Min. bei -80°C gefällt. Die Pelletierung erfolgte für 30 Min. bei RT und 14000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 90 µl Wasser und 10 µl 3 M

Natriumacetat-Lösung pH 5,2 resuspendiert. Nach Zugabe von 1 ml Ethanol wurde erneut für 15 Min. bei -80°C die DNA gefällt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet in der SpeedVac vollständig getrocknet. Zum Pellet wurden 90 μl Wasser und 10 μl Piperidin gegeben, die Reaktionsgefäße mit Parafilm abgedichtet und für 30 Min. bei 90°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in Eis kurz abgekühlt und in der SpeedVac vollständig getrocknet. Das Pellet wurde noch zweimal mit je 50 μl Wasser gewaschen und wiederum bis zur Trockne einrotiert. Nach Messung im Szintillationszähler wurden die Proben in Formamid-Auftragspuffer aufgenommen, so dass sich eine Konzentration von ca. 5000 cpm/ μl ergab. Die Proben wurden für 3 Minuten bei 95°C erhitzt und anschließend in Eis abgekühlt. Die Analyse erfolgte in einem 12% Sequenzgel.

4.2 T4 DNA-Polymerase-Kartierung

Für Kinetikuntersuchungen wurden 5 μg Plasmid dspTZ18u, ca. 30000 cpm einseitig radioaktiv markierte DNA und 60 μM der entsprechenden Platinverbindung in einem Endvolumen von 200 μl 0,1XTE bei 37°C inkubiert. Für jeden Zeitpunkt wurde dieser Ansatz bereit. Für Massentitrationen wurden je nach Verbindung Mengen zwischen 60 μM und 1600 μM gewählt und der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation wurden sofort 140 μl entnommen und mit 140 μl 0,5 M NaCl versetzt. Diese Proben wurden aufbewahrt und für die Bestimmung des r_B -Wertes weiter bearbeitet (s. III.2). Ein weiteres Aliquot von 20 μl wurde mit 5 μl 5x „Blue Juice“ Auftragspuffer versetzt und die Reaktionsprodukte in einem 1% Agarosegel/0,1xTBE bei 3 V/cm ÜN aufgetrennt. Das Gel wurde mit 0,2 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in 1XTBE gefärbt, unter UV visualisiert und mit einem Gel-Dokumentationssystem von Vilber Lourmat fotografiert.

Die verbliebenen 40 μl pro Inkubationsansatz wurden über Nick Columns G50 (0,1XTE) entsalzt und im Szintillationszähler vermessen. Für die Analyse des Oligonukleotids bzw. 177 bp DNA-Fragments auf einem 10% SDS-PAGE/0,1XTBE, 0,1% SDS wurden 20 μl entnommen und in der SpeedVac bis zur Trockne eingedampft. Die Proben wurden in 5 μl 1x „Blue Juice“ Auftragspuffer aufgenommen und bei 14 V/cm für 45 Minuten aufgetrennt. Die Fixierung erfolgte in einer Mischung aus 7% Essigsäure und 4% Glycerin für 15 Minuten. Das Gel wurde für 1,5 h unter

Vakuum bei 65°C getrocknet. Die Exposition des Films erfolgte über Nacht bei -80 °C.

Die verbliebenen Proben wurden bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 60 µl T4-Polymerase Puffer aufgenommen und mit 3 Units T4 DNA-Polymerase für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation erfolgte wiederum eine Entsalzung über Nick Columns, Messung im Szintillationszähler und Reduzierung der Proben bis zur Trockne. Der Rückstand wurde in 60 µl 250 mM NaCN aufgenommen und ÜN bei 45°C Platin von der DNA entfernt. Nach Entsalzung und Einengen bis zur Trockne wurde der Rückstand in 2 µl Formamid-Auftragspuffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte in einem 12% Sequenzgel. Zur grafischen Darstellung der mit der T4 DNA-Polymerase-Kartierung identifizierten Modifikationsstellen wurden ausgewählte Bahnen des entwickelten Films eingescannt und die relativen Intensitäten aufgetragen (Programm: ImageJ).

Zusammensetzung T4 DNA-Polymerase Puffer:

50 mM NaCl

10 mM Tris/HCl pH 7,5

25 mM MgCl₂

1 mM DTT

50 µg/ml BSA

5. Protein-DNA-Quervernetzung

5.1 Synthese der Bisamid-bisplatin(II)-Verbindung (ESS46)

a) Acetylierung von Histamindihydrochlorid mit Adipinsäuredichlord

1 g Histamindihydrochlorid (Merck[®]) und 2,2 g Triethanolamin wurden in trockenem Dimethylformamid (DMF) unter Argonatmosphäre für 2 h bei RT gerührt. Das mit 2 ml DMF gemischte Adipinsäuredichlorid (5,4 mmol, Merck[®]) wurde tropfenweise bei 0°C zugefügt und für weitere 2 h bei 0°C und weitere 18 h bei RT gerührt. Eine Lösung bestehend aus 1 g Histamindihydrochlorid und 1,1 g Triethanolamin in 50 ml trockenem DMF wurden der Reaktionsmischung zugegeben und weitere 3 Tage bei RT gerührt. Das teilweise ausgefallene Triethanolaminchlorid wurde über einen Faltenfilter abfiltriert und DMF durch Destillation von der Mischung abgetrennt. Der

Rückstand wurde in 200 ml Wasser aufgenommen und mit Natriumcarbonat gesättigt. Dabei fiel eine rotbraune, ölige Flüssigkeit aus, die mit einer Pipette abgenommen und über Nacht unter Vakuum getrocknet wurde. Der Rückstand wurde mit 60°C heißem 2-Propanol versetzt und filtriert. Nach Zugabe von Diethylether und Abkühlen im Eisbad bildete sich ein Niederschlag, aus dem nochmals mit einer Mischung aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert, und das analytisch reine Zwischenprodukt **1** (*N, N*¹-Adipoylbis(histamin)) erhalten wurde.

Die Ausbeute betrug 417 mg (= 1,25 mmol). Die Charakterisierung erfolgte mit ¹H-NMR (CD₃OD/D₂O).

Zwischenprodukt (1)

N1, N¹-Adipoylbis(histamin)

¹H-NMR (CD₃OD/D₂O), ARX300, 200 MHz

δ=1,5 (m, 4H, COCH₂-CH₂), 2,2 (m, 4H, COCH₂CH₂), 2,8 (t, ³J_{HH}, 4H, NCH₂CH₂), 3,4 (t, ³J_{HH}, 4H, NCH₂CH₂), 6,9 (s, 2H, Imidazol H), 7,6 (s, 2H, Imidazol H)

b) Ringbruch mit di-tert-Butyldicarbonat

Zwischenprodukt (**1**) wurde in 15,6 ml Acetonitril und 12,5 ml 15% Kaliumacetatlösung suspendiert und mit 2,72 g di-tert-Butyldicarbonat versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 5 Tage bei RT gerührt. Die obere organische Phase wurde mit einem Scheidetrichter abgetrennt und Acetonitril im Vakuum abgezogen. Mit 70 ml Ethylacetat wurde der Rückstand aufgelöst, zweimal mit 5% Natriumhydrogencarbonatlösung, zweimal mit Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Der Rückstand wurde mit 10 g Kieselgel versetzt, 20 Minuten gerührt und unter Vakuum einrotiert. Der Abdampfrückstand wurde auf eine Säule mit 30 g Kieselgel gegeben und mit einer Mischung aus Ethylacetat/Petrolether 1:9, zur Abtrennung von überschüssigem di-tert-Butyldicarbonat eluiert. Das Reaktionsprodukt (**2**) wurde durch Elution mit Ethylacetat/2-Propanol 95:5 erhalten.

c) Hydrogenierung

Raney Nickel in Wasser wurde 3-mal mit Ethanol gewaschen und zusammen mit dem in 50 ml Ethanol gelösten Zwischenprodukt (**2**) in die Hydrogenierungsvorrichtung eingebracht. Da Hydrogenierungsversuche unter den beschriebenen Bedingungen (24 h bei 40°C) nicht zur Hydrierung der Doppelbindung führte, wurde für 3 Tage bei 45°C und 80 bar hydrogeniert. Der erhaltene Rückstand wurde durch einen Filter vom Katalysator abgetrennt und durch eine Kieselgelsäule gereinigt. Durch Zugabe von Diethylether wurde das Reaktionsprodukt präzipitiert und in einer Mischung aus Ethanol/Diethylether umkristallisiert.

d) Entfernung der tert-Butoxycarbonyl-Schutzgruppen

Das aus der Hydrogenierung erhaltene Produkt wurde in Ethanol aufgenommen und 15 ml 1,25 M HCl in Methanol zugegeben. Die Mischung wurde für 6 h bei RT gerührt. Das kristalline Produkt N^4 , N^4 -Adipoylbis(1,2,4-triaminobutan)tetrahydrochlorid (**3**) wurde abfiltriert und dreimal mit Diethylether gewaschen und im Rotationsverdampfer bis zur Trockne einrotiert. Das Produkt wurde mit NMR charakterisiert.

Zwischenprodukt (**3**)

N^4 , N^4 -Adipoylbis(1, 2, 4-triaminobutan)tetrahydrochlorid

Nach Hydrogenierung und Entfernung der Schutzgruppen:

^{13}C (^1H)-NMR ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$), 150 MHz, Bruker AMX600

δ =25,2 (C-7), 30,6 (C-3), 35,2 (C-4), 35,6 (C-6), 41,2 (C-1), 47,6 (C-2), 178,0 (C-5)

e) Darstellung von Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)

0,83 g Kaliumtetrachloroplatinat (Merck[®]) wurden in 2 ml Wasser gelöst und zu 0,32 g Zwischenprodukt (**3**) gegeben. Unter Rühren wurde die Lösung auf 65°C erwärmt und tropfenweise 1 M NaOH zugegeben, um den pH-Wert zwischen 3,0 und 4,0 zu halten. Am Ende der Reaktion wurde der pH-Wert mit 0,1 M NaOH auf 5,0 eingestellt und die Lösung auf RT abgekühlt. Das ausgefallene gelbe Präzipitat wurde abzentrifugiert, zweimal mit kaltem Wasser, zweimal mit Ethanol und einmal mit

Diethylether gewaschen. Die vollständige Trocknung des Endprodukts erfolgte unter Vakuum im Rotationsverdampfer. Die Ausbeute betrug 6 mg.

Endprodukt (4):

Für die analytische Bestimmung des Endprodukts Cis-adipinsäure-bis [(1, 2 diaminobut-4-yl) amid]dichloro-platinum (II) mittels ^{13}C (^1H)-NMR wurde das Endprodukt (4) in DMSO gelöst.

^{13}C (^1H)-NMR (DMSO) Bruker AMX600, 150 MHz,

δ = 25,0 (C-7), 30,7 (C-3), 35,2 (C-6), 35,5 (C-4), 50,8 (C-1), 57,4 (C-2), 172,5 (C-5)

Durch Koordination mit Platin zeigte sich ein deutlicher shift der Kohlenstoffatome C-1 und C-2 zu niedrigeren Feldern (freier Ligand: C-1: 41,2; C-2: 47,2; Endprodukt: C-1: 50,8; C-2: 57,4).

5.2 Herstellung eines HeLa-Gesamtzell-Proteinextrakts nach Manley

Verwendete Puffer:

Hypotonischer Puffer:

0,01M Tris/HCl pH 7,9

0,001M EDTA

0,005M DTT

Puffer 1:

50 mM Tris/HCl pH 7,9

10 mM MgCl_2

2 mM DTT

25% Saccharose

50% Glycerin

Puffer 2:

50 mM Tris/HCl pH 7,9

6 mM MgCl_2

40 mM Ammoniumsulfat

0,2 mM EDTA

1 mM DTT

15% Glycerin

Anzucht der Zellen:

Hela S3 Suspensionszellen in RPMI-Medium (10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Penicillin) wurden in 2 l Roll-Zellkulturflaschen bis zu einer Zelldichte von ca. $9 \times 10^6/\text{ml}$ bei 37°C und 5% CO_2 hochgezogen. Die Zellzahl wurde durch Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt: 10 μl

Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau versetzt und die Zellzahl in der Neubauer-Kammer mikroskopisch bestimmt, wobei mortale Zellen blau gefärbt sind. Die Zelldichte wurde mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Waschen der Zellen:

Die Zellsuspension wurde bei 1100 rpm und 4°C für 10 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets in je 50 ml vorgekühltem PBS-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde wiederum bei 1100 rpm, 4°C und 10 Min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in insgesamt 40 ml PBS resuspendiert, auf zwei 50 ml Falkons verteilt und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 20 ml PBS resuspendiert, zentrifugiert (1100 rpm, 4°C, 10 Min.), der Überstand abgegossen und das Zellvolumen abgelesen (~ 4 ml).

Zellyse:

Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet mit dem 4-fachen Volumen (4 ml) an eiskaltem hypotonischem Puffer versetzt, dem vor Gebrauch ½ Tablette „complete protease inhibitor cocktail“ (Boehringer Mannheim) und 1 mM PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) in Dimethylsulfoxid (DMSO) pro 25 ml zugesetzt wurde. Die Zelllösung wurde 20 Min. auf Eis gestellt und anschließend in einen Dounce Homogenisator überführt. Die Zellen wurden mit ca. 30 Stößen aufgeschlossen und die vollständige Lyse der Zellen mit einem Hämocytometer unter dem Mikroskop kontrolliert. Die lysierten Zellen wurden mit dem vierfachen Zellvolumen (4 ml) an Puffer 1 versetzt, dem in 25 ml ½ Tablette „complete protease inhibitor cocktail“ und 1 mM PMSF zugesetzt wurde. Bei 4°C wurde vorsichtig bis zur Suspensionsbildung gerührt.

Extraktion:

Unter ständigem Rühren bei 4°C wurde ein Zellvolumen (1 ml) gesättigte, neutralisierte Ammoniumsulfatlösung tropfenweise zugegeben und 20 Min. vorsichtig gerührt. Zur Abtrennung hochmolekularer Bestandteile wie DNA und Mitochondrien wurde die viskose Zellsuspension auf 3 Ultrazentrifugenröhrchen verteilt und für 3

Stunden bei 50000 rpm und 4°C zentrifugiert (Beckmann Coulter, Optima LE 80 K Ultrazentrifuge, Rotor: Ti60).

Zum abgenommenen Überstand (8,5 ml) wurden 0,33 g/ml (= 2,8 g) festes Ammoniumsulfat zugefügt und anschließend 10 µl 1 M NaOH pro 1 g Ammoniumsulfat (= 28 µl) zugegeben, 30 Min. gerührt und für 20 Min. bei 15000 rpm und 2°C zentrifugiert (Sorvall RC50, Rotor: SS34). Der Überstand (9 ml) wurde verworfen und das Pellet in 1/10 Volumen des ÜS (900 µl) eiskaltem Puffer 2 (frisch zugesetzt: Proteaseinhibitor und PMSF) resuspendiert.

Dialyse:

Die Suspension wurde in einen Dialyseschlauch überführt und über Nacht bei 4°C gegen 1,5 l Puffer 2 dialysiert.

Aufbewahrung:

Die flockige Zellsuspension wurde für 10 Min. bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand (= 2,8 ml) abgenommen und portionsweise in flüssigen Stickstoff pipettiert. Die gefrorene Proteinlösung wurde mit einem Plastiksieb entnommen, sofort auf Trockeneis gelagerte Eppendorfgefäße verteilt und bei – 80°C eingefroren. Die Konzentration der Proteinlösung wurde nach Bradford bestimmt, und der Extrakt auf einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel analysiert.

5.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration des HeLa-Gesamtzellextrakts nach Bradford

Erstellung der Eichgerade

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford können Proteinkonzentrationen von 0,05-0,5 µg/ml bestimmt werden. Als Reagenz dient Coomassie-Brillant-Blau, dessen Absorptionsmaximum sich nach Bindung an ein Protein von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurde das Protein BSA verwendet, von dem eine Verdünnungsreihe mit dem Puffer P2 hergestellt wurde. Die verwendeten Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgeführt. Je 20 µl der BSA-Lösung wurden auf 1 ml mit Bradford-Reagenz aufgefüllt, invertiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm bestimmt. Als Referenz diente der Puffer P2. Pro

Verdünnung wurden zwei Ansätze bereitet und vermessen. Die gemessenen Werte und der errechnete Mittelwert sind in Tab. 3 dargestellt. Abb. 9 zeigt die daraus resultierende Eichgerade.

BSA (µg/20µl)	BSA(µg/µl)	Absorption	Absorption	Mittelwert
20	1	1,183	1,117	1,150
10	0,5	0,676	0,707	0,6915
5	0,25	0,353	0,340	0,3465
2,5	0,125	0,156	0,178	0,167
1	0,050	0,070	0,070	0,070
0,5	0,025	0,018	0,033	0,0255
0,25	0,0125	-0,011	0,024	0,0175
0,1	0,005	-0,002	0,001	-0,0005

Tab. 3: Ergebnis der Absorptionsmessung der BSA-Verdünnungsreihe in Puffer P2

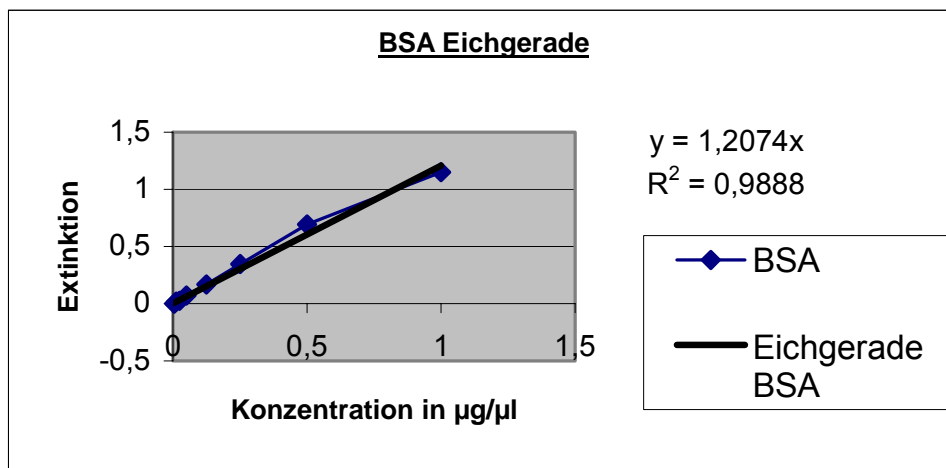


Abb. 8: BSA-Eichgerade

Bestimmung der Proteinkonzentration des HeLa-Gesamtzellextrakts

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration des HeLa-Gesamtzellextrakts wurden mit Puffer P2 mehrere Verdünnungen bereitet (Tab. 4). Je 20 µl jeder Verdünnung wurden mit Bradford-Reagenz auf 1 ml aufgefüllt und wie oben beschrieben die Absorption bei 595 nm gemessen. Durch Einsetzen der Absorptionswerte in die Geradengleichung der BSA-Eichgerade kann die Proteinkonzentration x berechnet werden:

$$y = 1,2074 \cdot x \Rightarrow x = y / 1,2074$$

Für die letzten Verdünnungsschritte konnte keine Absorption bestimmt werden. In die Berechnung der Proteinkonzentration fließen deshalb nur die ersten vier Werte ein,

deren Mittelwert eine Proteinkonzentration von 1,95 µg/µl ergab. Dies entspricht einer Gesamtausbeute von 5,46 mg HeLa-Gesamtzell-Proteinextrakt

Verdünnung	Absorption	Absorption	Mittelwert	Verdünnungs- faktor	Protein- Endkonz (µg/µl)
1:5	0,439	0,517	0,4755	5	1,969
1:10	0,203	0,278	0,2780	10	1,992
1:50	0,050	0,084	0,0670	50	2,775
1:100	0,023	0,003	0,0130	100	1,08
1:500	-0,023	0,022	-0,0005	500	
1:1000	0,002	-0,020	-0,009	1000	

Tab. 4: Bestimmung der Proteinkonzentration des HeLa-Gesamtzellextrakts.

Analyse des HeLa-Gesamtzellextrakts auf einem DISK-PAGE, 10%

Hierfür wurden ansteigende Mengen an Proteinextrakt (5, 10, 15 µg) in einem Endvolumen von 10 µl Puffer P2 mit 2,5 µl 5x „Blue-Juice“ Auftragspuffer versetzt, und in einem 10% DISK-PAGE (4% Sammelgel, 10% Trenngel) analysiert.

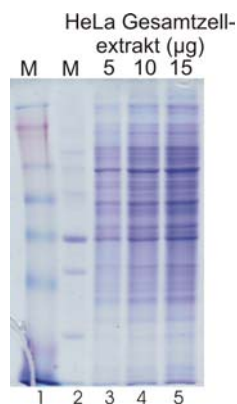


Abb. 9: Analyse des HeLa-Gesamtzellextrakts in einer DISK-PAGE.

5.3 Modifikation des 177 bp DNA-Fragments mit Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)

40 fmol eines radioaktiv markierten 177 bp DNA-Fragments wurden mit 0,1, 1 oder 5 μ M ESS46 in einem Endvolumen von 20 μ l 0,1XTE bei 37°C für 10 Min. inkubiert. Durch Zugabe von 400 mM NaCl wurde die Reaktion abgestoppt. Überschüssiges Platin wurde durch Gelfiltration (Nick Columns, G50) abgetrennt, und die entsprechende Fraktion der Gelfiltration auf eine Konzentration von ca. 3 fmol modifizierte DNA/ μ l eingengt. Die Analyse der modifizierten DNA erfolgte auf einem 4% SDS-Polyacrylamidgel.

5.4 Protein-DNA-Quervernetzung

Verwendete Puffer:

Puffer P1:

45 mM	HEPES/KOH pH 7,9
60 mM	NaCl
7 mM	MgSO ₄
1 mM	DTT

Puffer P2:

45 mM	HEPES/KOH pH 7,9
100 mM	NaCl
7 mM	MgSO ₄
1 mM	DTT

Puffer BP:

45 mM	HEPES/KOH pH 7,9
60 mM	KCl
7 mM	MgSO ₄
1 mM	DTT

Für die Analyse der Protein-DNA-QV wurden z.B. 32 fmol radioaktiv markiertes und mit ESS46 modifiziertes 177 bp DNA-Fragment mit 1,5 μ g HeLa-Gesamtzellextrakt in Anwesenheit eines Bindungspuffers (P1, P2 oder BP) in einem Endvolumen von 15 μ l 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze geteilt. Für die Analyse auf einem nativen 4% Polyacrylamidgel wurde ein Aliquot mit 1,875 μ l nativem Auftragspuffer versetzt und die Reaktionsprodukte in einem 4% nativen Polyacrylamidgel für eine Stunde bei 15 V/cm in 1XTBE aufgetrennt. Die Fixierung des Gels erfolgte für 15 Minuten in einer Mischung aus 4% Glycerin und 7%

Essigsäure. Anschließend wurde das Gel unter Vakuum bei 65°C für 1,5 h getrocknet. Die Exposition des Gels erfolgte bei -80°C über Nacht. Das zweite Aliquot wurde mit 1,875 µl 5x „Blue Juice“ Auftragspuffer versetzt und die Reaktionsprodukte in einem 4% SDS-Polyacrylamidgel für eine Stunde bei 15 V/cm in 1XTBE/0,1% SDS aufgetrennt. Die weitere Behandlung des Gels erfolgte analog dem nativen Gel. Während Optimierungsversuchen hat sich die Verwendung einer DNA-Modifikation von 5 µM ESS46 (s. III.5.3), die Inkubation in Puffer P2, und die Aufnahme des Aliquots für die Analyse im SDS-Gel in einem DTT-haltigen Auftragspuffer mit anschließendem Erhitzen für 3 Minuten bei 95°C bewährt.

5.5 Silberfärbung eines 4% SDS-Polyacrylamidgels mit ansteigenden Mengen an HeLa-Gesamtzellextrakt

Für eine Silberfärbung entsprechender Mengen an Protein, die für die Protein-DNA-QV verwendet wurden, wurden Ansätze wie unter Punkt III.5.4 bereitete ohne den Einsatz von DNA. Der Gellauf erfolgte ebenfalls in einem 4% SDS-Polyacrylamidgel für eine Stunde bei 15 V/cm in 1XTBE/0,1% SDS. Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 Minuten in 50% Methanol und anschließend nochmals für 10 Minuten in 5% Methanol gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation in einer DTT-Lösung (4 µl 1 M DTT in 100 ml Wasser) für 10 Minuten. Das Gel wurde dann gründlich in Wasser gewaschen bevor die Inkubation in einer 0,1% Silbernitrat-Lösung erfolgte. Danach wurde dreimal für 5-10 Sekunden mit Wasser gespült. Eine „Entwickler-Lösung“ wurde aus 3 g Natriumcarbonat und 0,05% Formaldehyd in 250 ml Wasser bereitet und in 100 ml dieser Lösung das Gel kurz inkubiert. Nach einem Waschriff mit Wasser wurden 150 ml der gleichen Lösung zugegeben und inkubiert, bis silbergefärbte Proteinbanden sichtbar wurden. Bei ausreichender Färbung wurde eine 20% Zitronensäurelösung zugegeben und danach mit Wasser gewaschen. Die Dokumentation des Gels erfolgte durch Fotografie des Gels mittels eines Dokumentationssystems von Vilber Lourmat. Das Gel wurde in einer Lösung aus 35% Ethanol und 2% Glycerin fixiert und anschließend für 2 h bei 65° unter Vakuum getrocknet.

5.6 Isolierung der Protein-DNA-Quervernetzung über Isopyknische Ultrazentrifugation

Für die Isolierung der Protein-DNA-QV wurden die unter Punkt III.5.4 verwendeten Mengen zur Darstellung der Protein-DNA-Bande verzehnfacht und der Ansatz 1 h bei 30°C inkubiert. Der Ansatz wurde mit einer Cäsiumchloridlösung (mittlere Dichte = 1,47 g/ml, Inkubationspufferbedingungen P2) auf 5 ml aufgefüllt. Die Mischung wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen überführt und einer Ultrazentrifugation (Beckmann Coulter, Optima LE 80 K Ultrazentrifuge, Rotor: Ti65) bei 65000 rpm unterzogen (21,5 h) und die Zentrifuge ohne Bremsen gestoppt. Das Röhrchen wurde vorsichtig in einen Gradientensammler eingespannt und an der Unterseite mit Hilfe einer Kanüle geöffnet. Es wurden 72 Fraktionen á ca. 70 µl gesammelt und ohne Szintillationsflüssigkeit in einem Szintillationszähler vermessen. (Ergebnisse s. Tab 1). Die Analyse ausgewählter Fraktionen erfolgte in einem nativen 4% Polyacrylamidgel (s. Ergebnisse und Diskussion).

Fraktion	cpm	Fraktion	cpm	Fraktion	cpm	Fraktion	cpm	Fraktion	cpm
1	410	16	947	31	566	46	950	61	552
2	1774	17	473	32	391	47	886	62	755
3	2356	18	731	33	331	48	972	63	645
4	2560	19	821	34	863	49	703	64	1101
5	2786	20	755	35	429	50	585	65	n.d.
6	3072	21	883	36	493	51	545	66	1439
7	2619	22	785	37	567	52	638	67	1127
8	2192	23	750	38	760	53	1818	68	1318
9	1994	24	799	39	707	54	397	69	1458
10	1647	25	897	40	622	55	275	70	1259
11	1307	26	743	41	672	56	480	71	3038
12	1298	27	608	42	511	57	377	72	146
13	1183	28	921	43	533	58	385		
14	1109	29	535	44	715	59	227		
15	1054	30	663	45	837	60	211		

Tab. 5: Ergebnisse der Szintillationsmessung (cpm) der gesammelten Fraktionen nach UZ.

5.7 Isolierung des Protein-DNA-Komplexes über Bandenelution und nachfolgender Identifizierung des Proteins über Massenspektrometrie

Für die Isolierung der Protein-DNA-QV aus einem 4% SDS-Polyacrylamidgel wurden 30 Ansätze wie unter Punkt 5.4 beschrieben verwendet (Modifikation des 177 bp DNA-Fragments mit 5 μ M ESS46, Bindungspuffer P2, HeLa-Gesamtzellextrakt 1,5 μ g) und der komplette Ansatz zu Aliquoten á 15 μ l unter Verwendung eines DTT-haltigen Auftragspuffers in einem 4% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden nicht fixiert und nicht getrocknet, sondern auf einer der beiden Glasplatten belassen, mit Frischhaltefolie abgedeckt und nass in einer Filmkassette bei Raumtemperatur exponiert. Dabei wurde die genaue Position des Gels und des aufgelegten Films markiert. Der entwickelte Film wurde unter die Glasplatte gelegt, wobei genau auf die Markierung zu achten war, und fixiert. Nach vorsichtigem abnehmen der Folie, wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten, wobei der ausgeschnittene Bereich sehr eng gehalten wurde, um kontaminierende Proteine zu vermeiden. Für die Kontrollmessung wurde eine entsprechende Menge Proteinextrakt auf 30 Bahnen verteilt, wobei pro Gel immer ein Protein-DNA-QV Ansatz mit analysiert wurde, zur genauen Bestimmung des auszuschneidenden Bereichs. Dieses Gel wurde wie oben beschrieben behandelt und exponiert. Damit eine Abschätzung der Menge des quervernetzten Proteins im 4% SDS-Polyacrylamidgel möglich war, wurde für zwölf der ausgeschnittenen Banden im Szintillationszähler die „cpm“ (Zerfälle pro Minute) bestimmt. Die entsprechenden Bahnen, aus der diese Banden ausgeschnitten wurden, wurden ebenfalls in einem Szintillationszähler vermessen. Diese Bahnen enthielten die freie, nicht quervernetzte DNA. Die Banden, welche die Protein-DNA-QV enthielten ergaben einen Wert von z.B. 25000 cpm, die kompletten Bahnen einen Wert von 65940 cpm. Das bedeutet, dass ca. 27% DNA retardiert wurden. Bei einer eingesetzten Menge von 32 fmol radioaktiv markierter DNA pro Bahn, entspricht dieses Ergebnis einer retardierten DNA-Menge von 8,6 fmol. Wenn man davon ausgeht, dass die molare Menge an retardierter DNA in etwa der molaren Menge an gebundenem Protein entspricht, ergibt dies einen Wert von 8,6 fmol Protein pro ausgeschnittener Bande. Damit würde eine Gesamtmenge von 260 fmol Protein für die massenspektrometrische Analyse zur Verfügung stehen.

Der Ausschnitt des Hintergrundbereichs erfolgte exakt auf der Höhe der mit analysierten Protein-DNA-QV, wobei auch hier der Bereich entsprechend eng ausgeschnitten wurde. Die ausgeschnittenen Banden der Protein-DNA-QV und die ausgeschnittenen Banden des Proteinhintergrunds wurden zerkleinert, getrennt vereinigt und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Hierfür wurden die Banden für 15 Minuten mit 800 µl 7% Essigsäure versetzt und anschließend die Essigsäure wieder entfernt. Danach wurde mit 800 µl 50% ACN (Acetonitril) für 15 Minuten bei 400 rpm geschüttelt. Nach Abnehmen des Überstands wurde mit 800 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung für 15 Minuten bei 400 rpm geschüttelt. Der Reduktionsschritt erfolgte mit einer 10 mM DTT-Lösung bei 56°C für 45 Minuten/300 rpm. Nach dem Entfernen der DTT-Lösung wurden die Gelbanden mit 800 µl 55 mM Iodacetamid-Lösung für 30 Minuten bei 400 rpm versetzt (Alkylierung). Danach wurde nochmals mit einmal ACN 50% und 50 mM Ammoniumbicarbonat-Lösung im Wechsel gewaschen. Für den Trypsinverdau wurde 1 µl Trypsinlösung (Promega®) in 400 µl Ammoniumbicarbonat-Lösung zu den Gelbanden gegeben und ÜN bei 37°C/400 rpm inkubiert. Der Überstand wurde komplett in ein neues Gefäß überführt und aufbewahrt. Zu den Gelbanden wurde 600 µl Millipore Wasser gegeben und nochmals 1 h bei RT/500 rpm inkubiert. Dieser Überstand wurde mit dem vorher gewonnenen Überstand vereinigt. Die Gelbanden wurden für 30 Minuten/500 rpm mit 50% ACN versetzt und der Überstand wiederum mit dem vorher gewonnen vereinigt. Zu den Gelbanden wurde eine Lösung aus 50% ACN die 0,1 % Trifluoressigsäure enthielt gegeben und wiederum für 30 Minuten bei 500 rpm inkubiert. Auch dieser Überstand wurde mit den übrigen vereinigt und bis zur Trockne in einer SpeedVac eingedampft. Der Rückstand wurde 3-mal mit je 200 µl Millipore Wasser versetzt, durch flüssigen Stickstoff gefroren und in einer SpeedVac bis zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde jeweils in 2 µl Ameisensäure aufgenommen, gelöst und auf 20 µl mit Millipore Wasser aufgefüllt.

Die Säulen für die Probenaufreinigung wurden selbst hergestellt und mit einem RP Säulenmaterial befüllt (C18 Material, 3M Empore™ High Performance Extractions Disks Kat. No. 2215C18). Diese Säulen wurden nacheinander mit 10 µl Isopropanol und zweimal mit 10 µl 5% Ameisensäure gespült. Die Proben wurden auf die Säulen gegeben und dann zweimal mit 5% Ameisensäure gewaschen. Die Elution der tryptischen Peptide erfolgte mit zweimal 10 µl 80% ACN welches 0,5 % Ameisensäure enthielt. Das Eluat wurde in der SpeedVac bis zur Trockne

eingedampft und vor der Messung in 5 µl 5% Ameisensäure aufgenommen, zur besseren Lösung für 30 Sekunden sonifiziert und in Probengefäße überführt. Die Proben wurden über einen Autosampler auf die LC-MS/MS aufgebracht. Die Vorsäule hatte einen Innendurchmesser von 100 µm, eine Länge von 2,5 cm und war mit einem C18 Material befüllt (Reposil-Pur200 C18AQ, 5 µm; Dr. Maisch GmbH). Der Innendurchmesser der Hauptsäule betrug 75 µm und die Länge 14 cm. Auch diese Säule war mit einem C18 Material bepackt (Reposil-Pur C18AQ, 3 µm; Dr. Maisch GmbH). Für die Chromatographie wurde für 55 Minuten ein Gradient des Lösungsmittels A (0,5% Ameisensäure in 2/98 ACN/Wasser) zum Lösungsmittel B (0,5% Ameisensäure in 80/20 ACN/Wasser) angelegt (s. Tab. 6). Nach der Messung der Proben durch einen ESI-Q-TOF (electrospray ionization quadrupole time-of-flight; Ultima, Waters[®]) Massenspektrometer, wurden die erhaltenen CID-Spektren mittels der ProteinLynx Software in pkl-Formate konvertiert, die für die Mascot Suche verwendet wurden.

Zeit	Prozent A	Prozent B	Flußrate
0.01	100.0	0.0	5.000
11.00	100.0	0.0	5.000
13.00	90.0	10.0	5.000
17.00	83.0	17.0	5.000
33.00	75.0	25.0	5.000
35.00	70.0	30.0	5.000
38.00	60.0	40.0	5.000
40.00	50.0	50.0	5.000
42.00	0.0	100.0	5.000
43.00	100.0	0.0	5.000
45.00	0.0	100.0	5.000
46.00	100.0	0.0	5.000
55.00	100.0	0.0	5.000

Tab. 6: Gradient für die Chromatographie bei der Massenspektrometrie.

Beschreibung einiger spezieller Methoden

1. Exkurs: DNA-Topologie [94-96]

Ein kurzer Einblick in die DNA-Topologie wird einige Begriffe einführen, die das Verständnis der durch Metallverbindungen verursachten globalen Veränderungen der DNA-Struktur vereinfachen sollen.

Strukturveränderungen der DNA können lokaler aber auch globaler Natur sein, wenn sich die Veränderungen auf eine ganze topologische Domäne erstrecken. Eine topologische DNA-Domäne beschreibt eine DNA-Form, deren topologische Parameter nicht ohne einen DNA-Strangbruch verändert werden können, wie z.B. bei der zirkulär kovalent geschlossenen Plasmidform (ccc).

Die **Verwindungszahl** L_k (= Verflechtung; „linking number“) gibt die Zahl der Windungen des einen DNA-Strangs um den komplementären zweiten Strang an. Die Verwindungszahl kann ohne die Einführung eines Strangbruchs nicht verändert werden und zählt deshalb zu den topologischen Parametern. Die Verwindungszahl ist auch Grundlage für die Bestimmung der superhelikalen Dichte, z.B. einer Plasmid DNA, die ein Maß für die Anzahl der fehlenden Windungen im Verhältnis zur Anzahl der Windungen in einer entspannten DNA ist: $\sigma = \Delta L_k / L_{k0}$.

Die **helikale Windungszahl** T_w (= Aufdrillung; „twisting number“) gibt die Zahl der Windungen des einen DNA-Strangs um die Achse der Doppelhelix an. Die Anzahl der Windungen der Doppelhelix um die Achse einer Superhelix beschreibt W_r , die **superhelikale Windungszahl** („writhing number“). Die helikale und die superhelikale Windungszahl zählen zu den geometrischen Eigenschaften und können auch ohne Einführung eines DNA-Strangbruchs nur durch Deformation einer DNA-Domäne verändert werden. Die 3 beschriebenen Größen L_k , T_w , W_r , lassen sich durch folgende, immer gültige Gleichung in Beziehung zueinander setzen:

$$L_k = T_w + W_r$$

Warum kann eine geschlossen zirkuläre DNA-Form in einer superzirkulären Form (sc) vorliegen? Eine Spannung der DNA kann durch eine oder mehrere Aufwindungen (= Verlust von DNA-Windungen) der DNA-Stränge verursacht werden, der z. B. ein DNA-Strangbruch mit nachfolgender Schließung vorausgegangen ist.

Diese Spannung kann durch eine „negative“ Superspiralisierung der DNA (teilweise) kompensiert werden. Diese Zusammenhänge der oben beschriebenen Größen bei der Bildung einer Superspirale sollen an einem Beispiel verdeutlicht werden: Betrachtet man ein zirkuläres, kovalent geschlossenes (ccc) Plasmid mit der Länge 800 Basenpaare, ist bei diesem Molekül im entspannten Zustand $L_k = 80$ und $T_w = 80$ (bei der vereinfachten Annahme, dass sich der eine DNA-Strang 1x pro 10 Basenpaare spannungsfrei um den anderen windet). Es gilt also:

$$\begin{aligned}L_k &= T_w + W_r \leftrightarrow \\80 &= 80 + 0\end{aligned}$$

Durch Beseitigung einer Windung aus einem geschlossenen DNA-Molekül, reduziert sich die Verwindungszahl L_k um eins, von $L_k = 80$ auf $L_k = 79$. Wenn das Molekül planar bleiben könnte, würde sich auch die helikale Windungszahl um eins verändern, so dass $L_k = T_w = 79$ wäre.

$$\begin{aligned}L_k &= T_w + W_r \leftrightarrow \\79 &= 79 + 0\end{aligned}$$

Das ist aber nicht möglich, weil sich der eine DNA-Strang 1x pro $(800 : 79 =) 10,13$ statt 10 Basenpaare um den anderen winden müsste, und dies zu einer energetisch ungünstigen Torsionsspannung führen würde. Um in eine energetisch günstigere (energieärmere) Form zu gelangen, nimmt das Molekül spontan eine andere als die planare Form an, eine superhelikale. Dabei nimmt die superhelikale Windungszahl, die beim entspannten Molekül 0 war, den Wert $W = -1$ an. Dadurch kann sich T_w nach obiger Gleichung wieder erhöhen, so dass $T_w = 80$ ist, und der eine DNA-Strang sich wieder alle 10 Basenpaare um den anderen winden kann.

$$\begin{aligned}L_k &= T_w + W_r \leftrightarrow \\79 &= 80 + (-1)\end{aligned}$$

Somit wäre eine fast ideale Helix wieder hergestellt. In dieser ist die Torsionsspannung in Krümmungsspannung übergegangen.

Eine komplette Entspannung der superhelikalen Form einer Plasmid-DNA kann durch die Spaltung einer Phosphodiesterbindung („nicking“) von einem DNA-Strang

erreicht werden, was zu einer offen zirkulären Plasmid Form (oc) führt. Die Zucker-Phosphatkette kann sich an der Spaltstelle frei um ihre Gerüstbindung drehen, das Molekül liegt frei von Torsionsspannung vor.

2. DNA-Sekundärstrukturveränderungen: DNA-Biegung und DNA-Aufdrilling

Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur können durch das Laufverhalten eines konventionell präparierten Plasmids in einem neutralen Agarosegel analysiert werden. "Konventionell" bedeutet, dass beide zirkuläre Formen, die kovalent "geschlossene", negativ superhelikale (sc) und die "offen" zirkuläre (oc), vorhanden sind. Die Analyse des Laufverhaltens beider Plasmidformen kann außerdem Hinweise über die Art der möglichen Addukte (mono-, bifunktional) von Metallverbindungen mit der DNA geben.

Metalladdukte, die die DNA lokal aufdrillen, verringern die helikale Windungszahl T_w . In der kovalent "geschlossenen", negativ superhelikalen (sc) Plasmidform führt dies zu einer Verringerung der Torsionsspannung der DNA und damit auch zu einer Verringerung der superhelikalen Windungszahl (W_r). Die damit verbundene Verringerung der superhelikalen Dichte bewirkt eine weniger kompakte Form des superzirkulären Plasmids, was eine langsamere Migration in der Gelelektrophorese verursacht [21]. Da die Adduktbildung von Metallkomplexen mit der DNA nicht einheitlich ist, erhält man keine diskrete neue Bande, sondern eine Verteilung verschiedener Spezies. Wenn beide Formen des Plasmids, (vormals) superzirkuläre (sc) und offen zirkuläre, relaxierte (oc) Form, komigrieren, ist der „Koaleszenzpunkt“ erreicht. An diesem Punkt liegt auch das kovalent geschlossene Plasmid völlig frei von Torsionsspannung vor. Es gilt: $W_r = 0$ und $L_k = T_w$. Wenn die Aufdrillingung soweit fortschreitet, dass die helikale Windungszahl kleiner als die Verwindungszahl L_k wird, werden in die DNA positive superhelikale Windungen eingeführt. Dies führt zu einer Erhöhung der superhelikalen Dichte und das Plasmid migriert wieder schneller im Gel. Ein lokales Aufdrillen der DNA führt also zu einer globalen DNA-Strukturveränderung, die im Agarosegel sichtbar ist. In aller Regel können durch Metallverbindungen gebildete monofunktionale Addukte die DNA aufdrillen, in seltenen Fällen (aktive *trans*-Isomere) können monofunktionale Addukte die DNA auch verbiegen.

Eine Modifizierung mit Metallkomplexen der offen zirkulären Form des Plasmids kann trotz des erhöhten Molekulargewichts und der Verringerung der negativen Ladungen zu deren Beschleunigung im Agarosegel führen. Für diesen Effekt wird eine die gerade erwähnten Parameter überlagernde "Kondensation" der DNA verantwortlich gemacht; sie wird durch multiple Biegungen („bents“), die nicht in Phase mit der DNA-Periodizität sind, verursacht [43]. Biegungen der DNA können entweder starrer aber auch flexibler Natur sein. Beide Formen können durch bifunktionale Metall-DNA-Addukte hervorgerufen werden [40]. Mit dem verwendeten Ansatz können die flexible und starre Biegung nicht unterschieden werden.

Induzierte Strukturveränderungen der DNA müssen aber nicht in jedem Fall die Reaktivität einer Verbindung widerspiegeln. D.h. Verbindungen, die gleich starke Strukturveränderungen der DNA hervorrufen, müssen nicht unbedingt die DNA zum gleichen Ausmaß modifiziert haben. Andererseits bedeutet eine DNA-Platinierung nicht zwangsläufig induzierte Strukturveränderungen. Um eine Quantifizierung der DNA-Metallierung zu ermöglichen, wurden deshalb für einige Verbindungen die r_b -Werte der reagierten DNA über ICP-MS ermittelt. Neben dieser quantitativen Ermittlung der Plasmidplatinierung wurde zusätzlich der Modifikationsgrad der DNA durch einen einfacheren und schnelleren visuellen Test bestimmt. Dazu wurde jedem Ansatz mit Plasmid-DNA eine geringe Menge eines radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragments zugefügt, und der Ansatz wurde zusätzlich in einem neutralen Polyacrylamidgel analysiert. Die Erhöhung des Molekulargewichts und die zusätzlichen positiven Ladungen auf der DNA, bedingt durch die Metallverbindung, resultierte in einer Retardation des Fragments im Gel, die mit der Reaktivität der Verbindung korrelierbar ist. Mit diesem Ansatz war es nun meistens möglich, die Strukturveränderungen der DNA und die Reaktivität der Verbindung zeitsparend und einfach in einem einzigen Versuchsansatz zu bestimmen.

3. Bestimmung der intermolekularen Quervernetzungen (QV)

Ein Biegen der DNA kann sowohl durch intramolekulare [30] als auch durch intermolekulare [36] Quervernetzungen hervorgerufen werden. Biegen der DNA im Allgemeinen kann, wie oben erklärt, durch die Plasmidmigration in einem neutralen Agarosegel nachgewiesen werden. Um zu unterscheiden, ob ein Biegen der DNA auch durch intermolekulare QV der Verbindung mit der DNA hervorgerufen wird, wurde das folgende System angewandt und verbessert:

Zur Produktion qualitativ hochwertigerer Ergebnisse wurden 3 verschiedene Gelsysteme zur Analyse der intermolekularen QV verwendet und verglichen: a) Die „herkömmliche“ Analyse der intermolekularen QV erfolgte mit einem linearisierten, radioaktiv markierten Plasmid oder einem radioaktiv markierten DNA-Fragment mit anschließender Analyse der Reaktionsprodukte in einem denaturierenden Agarosegel. Die Qualität der aufwendig zu trocknenden Agarosegele, war aber oft unbefriedigend; b) Analyse der Reaktionsprodukte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Harnstoffgel; c) Analyse der Reaktionsprodukte in einem kontinuierlichen Polyacrylamid-Harnstoffgel. Wie die Abb. 10 (Bestimmung der intermolekularen QV von Cisplatin) zeigt, konnte mit der Auftrennung der Reaktionsprodukte im diskontinuierlichen und kontinuierlichen PAA-Harnstoffgel eine wesentlich bessere Qualität erzielt werden als im herkömmlichen System (a). Wegen der Einfachheit des kontinuierlichen Gelsystems wurde dies für alle durchgeführten Versuche verwendet.

In Anwesenheit von denaturierendem Harnstoff läuft die vorher doppelsträngige DNA als Einzelstrang-DNA im Gel. Wenn die Verbindung intermolekulare QV ausbilden kann, also gegenüberliegende Basen der DNA vernetzt, wird eine neue, langsamere laufende Spezies im Vergleich zur Kontrolle im Gel sichtbar. Diese Spezies repräsentiert vorher doppelsträngige DNA, die mindestens eine intermolekulare QV enthält und deshalb im denaturierenden Gel nicht mehr getrennt werden kann; sie ist im denaturierenden Gel ansonsten unstrukturiert und wenig kompakt und läuft deshalb langsamer. Eine weitere Inkubation kann wie in Abb. 10 B ab Bahn 5 sichtbar, zu einer Beschleunigung dieser Spezies im Gel führen. Die Zunahme der Mobilität ist auf eine erhöhte Kompaktheit, verursacht durch mehrere intermolekulare QV der DNA, zurückzuführen. Diese Spezies ähnelt in Form und Verhalten einer doppelsträngigen DNA.

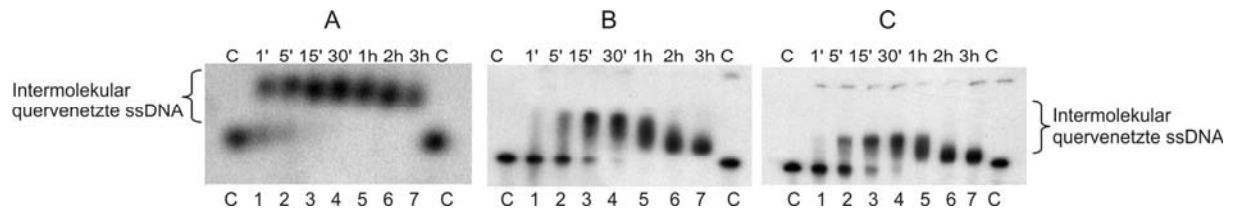


Abb. 10: **Analyse der intermolekularen QV von Cisplatin bei Verwendung unterschiedlicher Gelsysteme:** Abb. **A:** denaturierendes 1% Agarosegel; **B:** diskontinuierliches Polyacrylamid-Harnstoffgel; **C:** kontinuierliches Polyacrylamid-Harnstoffgel. Gezeigt sind die Autoradiogramme der Reaktionsprodukte von 60 μ M Cisplatin in 0,1X TE Puffer mit radioaktiv markierter 177 bp dsDNA nach Inkubation für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 1-7); **C** = Kontroll-DNA

Ergebnisse und Diskussion

I. Konzept der Organspezifität („drug-targeting“): Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe

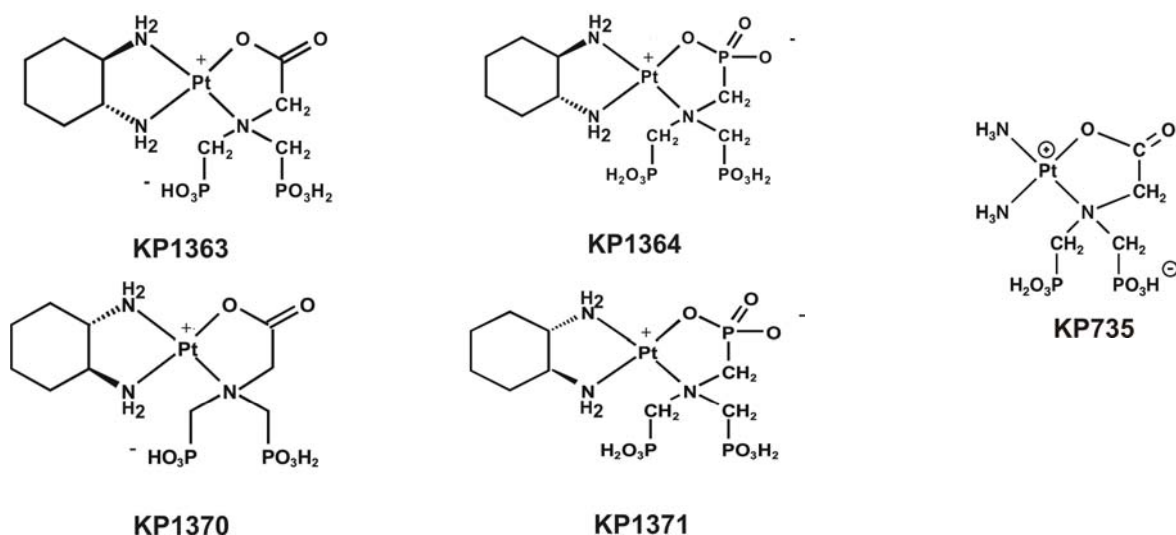


Abb. 11: Formeln der untersuchten Platin(II)-Biphosphonat Komplexe

Ein Problem in der Therapie mit platinhaltigen Chemotherapeutika stellt u. a. deren ungenügende Organspezifität dar. Mit der Synthese von Platin(II)-Biphosphonat-Komplexen sollte diese Spezifität durch Kombination der zytotoxischen Eigenschaft der Platineinheit, und der bekannten Fähigkeit von Biphosphonaten an die Oberfläche von Knochen zu binden [97], verbessert werden. Mit der Vereinigung dieser Eigenschaften sollte eine effektivere Behandlung von Osteosarkomen, aber auch von Knochenmetastasen möglich sein.

Eine der ersten synthetisierten Komplexe dieser Klasse war die Verbindung KP735 [98]. Sie stellt eine Kombination der parentalen Verbindung Cisplatin und einer Biphosphonatgruppe dar. Zu der Reihe von Platin(II)-Biphosphonat-Komplexen gehören auch die Verbindungen KP1363, KP1364, KP1370 und KP1371 [99,100] (Abb. 11), bei denen der Diaminocyclohexan-Ring (DACH-Ring) in Anlehnung an Oxaliplatin den bleibenden Liganden darstellt. Damit wollte man die verbesserten Eigenschaften von Oxaliplatin (s. Einleitung), im Vergleich zu Cisplatin, mit der Knochenanbindung der Biphosphonate kombinieren.

Obwohl für diese Verbindungen und weitere Vertreter dieser Klasse nur eine mäßige Zytotoxizität in den untersuchten Zelllinien beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 7) [100,101], war die Aktivität in vivo hoch: In einem Tumormodell (orthotopisch transplantiertes Osteosarkom in der Ratte) konnte eine hohe Wirksamkeit gegen das Osteosarkom und die von ihm ausgehenden Metastasen nachgewiesen werden [102-104]. Die Akkumulation von Platin(II)-Biphosphonat-Komplexen an das Hydroxyapatit des Knochens von Ratten wurde durch ^{14}C -Markierung und anschließender Autoradiographie nachgewiesen [105]. Auch die hier untersuchten Komplexe zeigten eine hohe antitumorale Aktivität in einem Leukämie-Mausmodell. Die hohe antitumorale Aktivität in vivo bei gleichzeitig niedrigem zytotoxischen Potential in vitro könnte auf eine Aktivierung der Verbindungen in vivo hinweisen. Untersuchungen von KP735 und verschiedenen Platin(II)-Biphosphonat-Komplexen in vitro zeigten eine schwache Anbindung an Kalbsthymus DNA bzw. an dGMP und dGpG, aber eine signifikante Beschleunigung der Anbindung in Anwesenheit von Calcium [105-107]. Diese Beobachtung könnte eine Aktivierung – außer durch die in vivo nachgewiesene Akkumulation am Knochen – durch das im Knochen enthaltene Calcium bedeuten. Die Wechselwirkung von Calcium mit der Biphosphonatgruppe könnte zu einer Labilisierung der Bindungen zum Platinatom und zu einer beschleunigten Dissoziation der Fluchtgruppe führen [106,108].

In dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob Calcium Einfluss auf die Adduktbildung der Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe mit DNA hat.

Verbindung (Expositionszeit)	Zelllinie	
	CH1 (ovary)	SW480 (colon)
KP1363 (96 h)	20.6	260
KP1364 (96 h)	11.8	25.5
KP1370 (96 h)	52.4	385
KP1371 (96 h)	35.6	126
KP735 (96 h)	128	--

Tab. 7: Zytotoxizität (IC_{50} , μM) der Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe in zwei humanen Krebszelllinien.

Ergebnisse

1. DNA-Sekundärstrukturveränderungen und Reaktivität gegenüber DNA

Abb. 12 zeigt die Analyse der Interaktion der Verbindung KP1363 (60 μ M) mit Plasmid und einem radioaktiven DNA-Fragment in An- und Abwesenheit von Calcium. Auch nach siebenstündiger Inkubationszeit konnten keine Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur oder eine Veränderung des Laufverhaltens des DNA-Fragments beobachtet werden, weder in Ab- noch in Anwesenheit von Calcium.

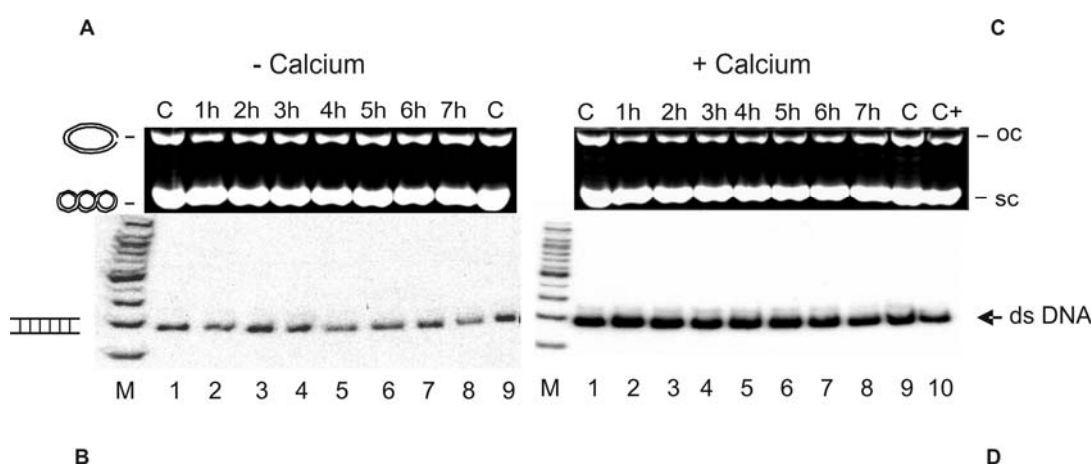


Abb. 12: Analyse der Inkubation (37°C) von 60 μ M Verbindung KP1363 mit Plasmid pTZ18u (**A**, **C**) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (**B**, **D**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) in Ab- (**A**, **B**) und Anwesenheit (**C**, **D**) von 120 μ M Calciumchlorid und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**, **C**), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (**B**, **D**). Bahn 1 (C): Kontroll-DNA nicht inkubiert, Bahn 9 (C): Kontroll-DNA 7 h inkubiert, Bahn 10 (C+): Kontroll-DNA, 7 h in Anwesenheit von 120 μ M Calciumchlorid inkubiert, M = 50 bp DNA-Leiter.

Um festzustellen, ob dieser Komplex überhaupt mit DNA reagieren kann, wurde eine Massentitration (Abb. 13) durchgeführt. Dazu wurde Plasmid mit steigenden Mengen an Verbindung für 7 Stunden inkubiert und die Reaktionsprodukte im Agarosegel analysiert. Wie in Abb. 13 zu sehen ist, kann KP1363 in höheren Konzentrationen die DNA aufwinden (langsamere Migration der superzirkulären Plasmidform) und biegen (schnellere Migration der offen zirkulären Form). Allerdings konnte auch hier die Zugabe von Calcium keine schnellere Ausbildung von Strukturveränderungen der DNA hervorrufen (Bild nicht gezeigt). Auch für das Stereoisomer KP1370 konnten

sowohl bei der Kinetikuntersuchung als auch bei der Massentitration gleiche Beobachtungen gemacht werden (Bilder nicht gezeigt).

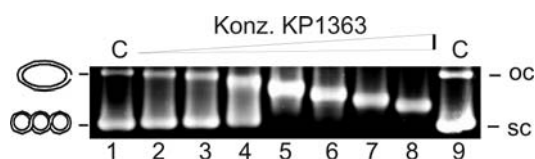


Abb. 13: Agarosegelelektrophorese der Inkubation (7 h/37°C) von Plasmid pTZ18u mit steigenden Mengen KP1363 (Bahn 2-8 entsprechend 60, 100, 200, 300, 400, 500, 600 µM Verbindung). Bahn 1 (C): Kontroll-DNA, Bahn 9 (C): Kontroll-DNA 7 h inkubiert.

Die Verbindungen KP1364/KP1371 konnten im Gegensatz zu den vorher besprochenen Verbindungen eine sehr kleine Veränderung der DNA-Sekundärstruktur induzieren, v. a. konnte ein Biegen der DNA durch eine etwas schnellere Migration der offen zirkulären Plasmidform detektiert werden (Daten nur für KP1371 gezeigt, s. Abb. 14). Die Zugabe von Calcium bewirkte eine geringfügige Beschleunigung der Ausbildung von DNA-Strukturveränderungen, sichtbar durch die nun langsamere Migration der superzirkulären Plasmidform und die Beschleunigung der offenzirkulären Plasmidform im Agarosegel. Diese geringfügig höhere Effizienz der DNA-Adduktbildung ist auf eine höhere Modifikation der DNA zurückzuführen, da das im Polyacrylamidgel analysierte radioaktive DNA-Fragment eine Verlangsamung erfährt. Auch für diese Verbindungen wurde eine Massentitration durchgeführt, die eine geringfügig erhöhte Reaktivität gegenüber DNA im Vergleich zu KP1363 und KP1370 bestätigte. Aber auch unter den Bedingungen der Massentitration konnte keine starke Zunahme der Reaktivität der Verbindungen in Anwesenheit von Calcium gegenüber DNA festgestellt werden (Bilder nicht gezeigt).

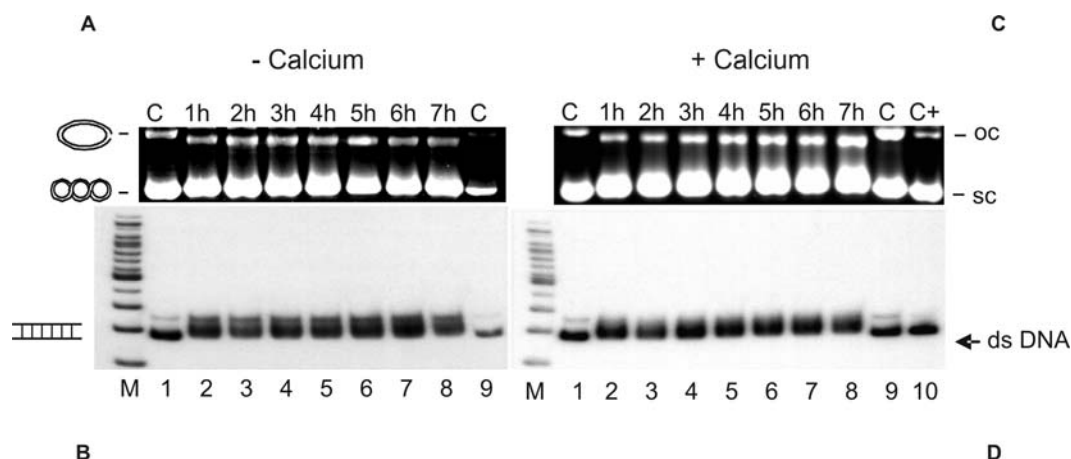


Abb. 14: Analyse der Inkubation von 60 µM Verbindung KP1371 mit Plasmid pTZ18u (**A, C**) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (**B, D**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) in Ab- (**A, B**) und Anwesenheit (**C, D**) von 120 µM Calciumchlorid und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A, C**), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (**B, D**). Bahn 1 (**C**): Kontroll-DNA nicht inkubiert, Bahn 9 (**C**): Kontroll-DNA 7 h inkubiert, Bahn 10 (**C+**): Kontroll-DNA 7 h in Anwesenheit von 120 µM Calciumchlorid inkubiert, M = 50 bp DNA-Leiter.

Das Cisplatinderivat KP735 zeigte bei der Analyse der DNA-Sekundärstrukturveränderungen ein geringfügiges Aufdrillen und Biegen (Abb. 15). Die Zugabe von Calcium hatte aber keinen Einfluss (Bild nicht gezeigt), ähnlich den Komplexen KP1363 /KP1370.

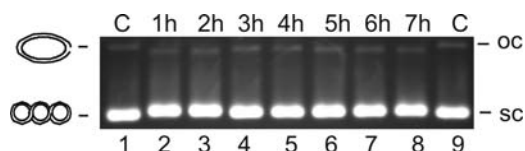


Abb. 15: Analyse der Inkubation von 60 µM Verbindung KP735 mit Plasmid pTZ18u für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) durch elektrophoretische Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt). Bahn 1 (**C**): Kontroll-DNA nicht inkubiert, Bahn 9 (**C**): Kontroll-DNA, 7 h inkubiert.

Für alle Verbindungen wurden die oben beschriebenen Untersuchungen in Anwesenheit verschiedener Calciumsalze (Chlorid, Nitrat, Sulfat) und bei unterschiedlichen (niedrigeren sowie höheren als 120 µM) Konzentrationen der Calciumsalze wiederholt. Unter keiner der gewählten Bedingungen zeigte sich eine erhöhte Reaktivität der Komplexe gegenüber DNA.

Eine interessante Beobachtung konnte jedoch für die stereoisomeren Verbindungen KP1364 und KP1371 und auch für KP735, und zwar sowohl in Ab- als auch in

Anwesenheit von Calcium, gemacht werden: Schon nach einstündiger Inkubation zeigte sich bei der Migration des Plasmids und des DNA-Fragments (Abb. 14 und 15) die jeweilige Veränderung des Laufverhaltens der beiden DNA-Spezies im Gel; dieses Muster änderte sich jedoch bei zunehmender Inkubationsdauer nicht mehr. In anderen Worten: Nach einer schnellen Initialreaktion (≤ 1 St.) wurde ein thermodynamisches Reaktionsgleichgewicht erreicht, das bei den vorliegenden Edukt-Konzentrationen trotz längerer Inkubation nicht mehr signifikant verändert wurde; dieses Gleichgewicht befindet sich also auf der "linken" Seite der Reaktionsgleichung:



Dieses Gleichgewicht konnte nur bei Erhöhung der Verbindungsmengen verändert und mehr auf die "rechte" Seite der Gleichung verschoben werden (= "Massentitration", s. z. B. Abb. 19 A). Eine Erklärung dieses Phänomens könnte eine ausgeprägte *Sequenzspezifität* dieser Verbindungen sein, d.h. dass die Komplexe nur mit einer *begrenzten Anzahl* an Basen der DNA reagieren, mit anderen dafür gar keine Reaktion eingehen können – es sei denn die Sequenzspezifität wird nach dem Massenwirkungsgesetz durch "Konzentrationsdruck" (teilweise) überwunden. In diesem Fall wäre also eine zutreffendere Beschreibung der obigen Reaktion die folgende:



Um die angenommene Sequenzspezifität der Verbindungen zu überprüfen, wurde eine T4 DNA-Polymerase-Kartierungsreaktion mit der Platin(II)-Biphosphonat Verbindung KP1371 durchgeführt (s. Material und Methoden), deren Ergebnisse im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

2. Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase: Prinzipien

Mit Hilfe der T4-Polymerase, die in Abwesenheit von Nukleotiden eine starke 3'→5' exonukleolytische Aktivität hat, können DNA-Bindungsstellen von Platinverbindungen identifiziert werden, da die Exonukleasefunktion vor einer modifizierten Base inhibiert wird. Die Analyse der Spaltungsprodukte einer radioaktiv endmarkierten DNA in einem Sequenzgel gibt dadurch Aufschluss über die Position der Modifikationen.

Für die Modifikationskartierung der Verbindung KP1371 wurden die Nukleotidbindestellen auf 3 unterschiedlichen DNA-Vorlagen bestimmt:

- 1) Ein doppelsträngiges Oligonukleotid (Sequenz s. Abb. 16), bei dem entweder der Strang L1 (Bezeichnung L1L2), oder der komplementäre Strang L2 (Bezeichnung L2L1) kartiert wurden.
- 2) Ein doppelsträngiges Oligonukleotid (Sequenz s. Abb. 21), bei dem der "obere" Strang kartiert wurde (Oligobezeichnung KMfw).
- 3) Ein 177 bp DNA-Fragment, bei dem die Kartierung des "oberen" Strangs erfolgte (Ausschnitt der Sequenz s. Abb. 24)

Als Kartierungsreferenz diente die Maxam-Gilbert-Sequenzleiter des L1L2 bzw. L2L1 Oligonukleotids, und des jeweiligen "oberen" Strangs des 177 bp DNA-Fragments bzw. des KMfw Oligonukleotids (s. Material und Methoden). Um die Stoppstellen der T4 DNA-Polymerase auf der mit KP1371 modifizierten DNA korrekt zu bestimmen, muss folgendes beachtet werden: Die Banden der Maxam-Gilbert Sequenzleiter laufen um ca. 1,5 Banden schneller als die korrespondierenden, nach enzymatischen Abbau durch T4 DNA-Polymerase erhaltenen DNA-Spaltprodukte. Grund dafür ist, dass die Maxam-Gilbert Sequenzierung Fragmente erzeugt, denen das sequenzbestimmende Nukleosid fehlt (eine Bande Laufunterschied), und die folglich am 3' Ende eine Phosphatgruppe tragen (zusätzlich 0,5 Banden Laufunterschied). Im Gegensatz dazu ist am 3'-Ende der Fragmente aus dem enzymatischen Abbau mit T4 DNA-Polymerase das Nukleosid mit einer OH-Gruppe vorhanden.

Als Kontrolle wurden zusätzlich die DNA-Bindungsstellen von Oxaliplatin, da KP1371 auch den Diamincylcohexan-Ring (DACH) als Struktureinheit enthält, und die Bindungsstellen des parentalen Cisplatins als Referenzverbindung identifiziert. Für die parallele Analyse der DNA-Strukturveränderungen wurde jedem Inkubationsansatz Plasmid zugesetzt.

2.1. Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, L2L1

Abb. 16 zeigt das Ergebnis der Modifikationskartierung der Verbindungen KP1371, Cisplatin und Oxaliplatin nach Inkubation mit dem Oligonukleotid L2L1 für die angegebenen Zeitpunkte. Die diesen Inkubationszeitpunkten entsprechenden Strukturveränderungen der DNA wurden ebenfalls analysiert (s. Abb. 16 A).

Wie Abb. 16 zeigt, reagiert KP1371 mit DNA, aber auch hier kam es, wie bei den vorangegangenen Versuchen mit Plasmid, nach einer schnell erfolgten Modifikation der DNA zu keiner weiteren, signifikanten Reaktion (keine klare Kinetik). Dies war sichtbar durch die gleich bleibende Intensität der Spaltprodukte nach T4 DNA-Polymerase Behandlung. Das Hauptsignal von KP1371 entspricht einer Platinierung des Guanins an Position 19. Zwei weitere schwächere Signale entsprechen einer Modifikation von Adeninen an den Position 15 und 24 des L2 Strangs.

Oxaliplatin zeigte übereinstimmend mit den DNA-Strukturveränderungen zunächst nur eine geringe Reaktivität gegenüber DNA, die jedoch, im Gegensatz zu KP1371, mit zunehmender Inkubationszeit anstieg. Dabei zeigte Oxaliplatin nach 7 h ein Muster (G19 Hauptsignal, A15 und A24 Nebensignale), welches dem Muster von KP1371 nach einer Inkubationszeit von allerdings nur 2 h entsprach.

Im Gegensatz zu KP1371 und Oxaliplatin zeigte Cisplatin eine stark abweichende Verteilung der Hauptintensitätssignale. Interessanterweise spielte das Hauptsignal für KP1371 und Oxaliplatin (G19) bei Cisplatin eine untergeordnete Rolle, dafür traten andere Modifikationsstellen in den Vordergrund: Für Cisplatin konnten die Adenine an den Positionen 15 und 24, die gegenüber Oxaliplatin und KP1371 eine nur schwache Affinität zeigten, als die bevorzugten Modifikationsstellen auf diesem Oligonukleotidstrang identifiziert werden. Die sichtbaren Signale am oberen Gelende (3'-Bereich des Oligonukleotids) variierten von Ansatz zu Ansatz und waren auch bei einigen Negativkontrollen zu sehen (z. B. Abb. 16, Bahn 9; Abb. 19 Bahn 14). Wir vermuten, dass sie das Ergebnis eines „Stotterns“ der T4 DNA-Polymerase am Anfang der DNA-Spaltung waren. Diese Signale werden im Folgenden nicht weiter ausgewertet.

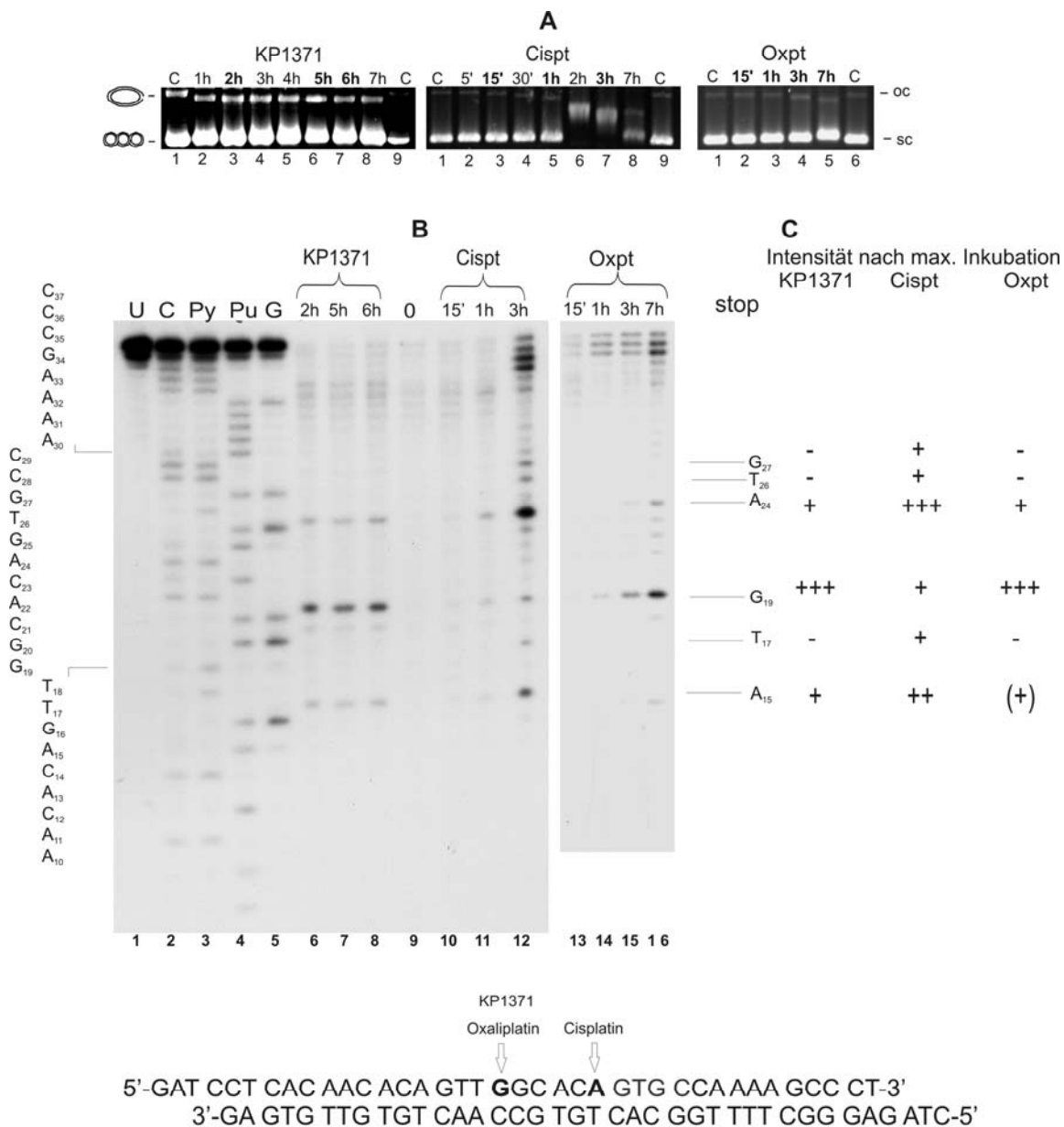


Abb. 16 **A**: (DNA-Sekundärstrukturveränderungen): Analyse der Reaktionsprodukte von Plasmid pTZ18u, Oligonukleotid L2L1 (nicht sichtbar) und 60 μ M KP1371 (Bahnen 2-8), 60 μ M Cisplatin (Bahnen 2-8) und 60 μ M Oxaliplatin (Bahnen 2-5) für die angegebenen Zeitpunkte, nach Inkubation und vor T4 DNA-Polymerase Reaktion in einem Agarosegel (EtBr gefärbt); C: Kontroll Plasmid; **B**: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte der Interaktion von Oligonukleotid **L2L1** (L2 Strang 5' radioaktiv endmarkiert) mit 60 μ M KP1371 (Bahnen 6-8), 60 μ M Cisplatin (Bahnen 10-12) oder 60 μ M Oxaliplatin (Bahnen 13-16) für die angegebenen Zeitpunkte nach enzymatischem Abbau durch T4 DNA-Polymerase und Auftrennung in einem denaturierenden 12% Harnstoff-Polyacrylamidgel (Plasmid nicht sichtbar). 0 = nicht modifiziertes L2L1 Oligonukleotid, U = nicht behandeltes L2L1 Oligo, C = Cytosin Sequenz Leiter, Py = Pyrimidin Sequenzleiter, Pu = Purin Sequenzleiter, G = Guanin Sequenzleiter. Die Koordinaten der DNA-Basen sind am linken Rand angegeben. **C**: Identifizierte Stoppstellen („stop“) der T4 DNA-Polymerase, und deren Intensitätsvergleich. **D**: Sequenz von L2L1 und die Hauptanbindungsstellen der untersuchten Komplexe.

Um festzustellen, ab welcher Inkubationszeit die identifizierten Stoppstellen des Komplexes KP1371 initial sichtbar werden, und ob eine Kinetik bei geringeren Inkubationszeiten besser zu verfolgen ist, wurde KP1371 mit dem Oligonukleotid L2L1 für kürzere Zeit inkubiert (Zeitpunkte s. Abb. 17) und die Modifikationsstellen auf der DNA ermittelt. Erstaunlicherweise zeigte KP1371 schon nach einer Minute das gleiche Muster, d.h. das Guanin an Position 19 wurde sofort modifiziert, wobei aber wiederum keine weitere, signifikante Veränderung des DNA-Platinierungsmusters erfolgte. Nur die Zeitabhängigkeit der Modifikation der deutlich schwächer präferierten A15- und A24-Stellen wurde hier vielleicht etwas eindeutiger sichtbar.

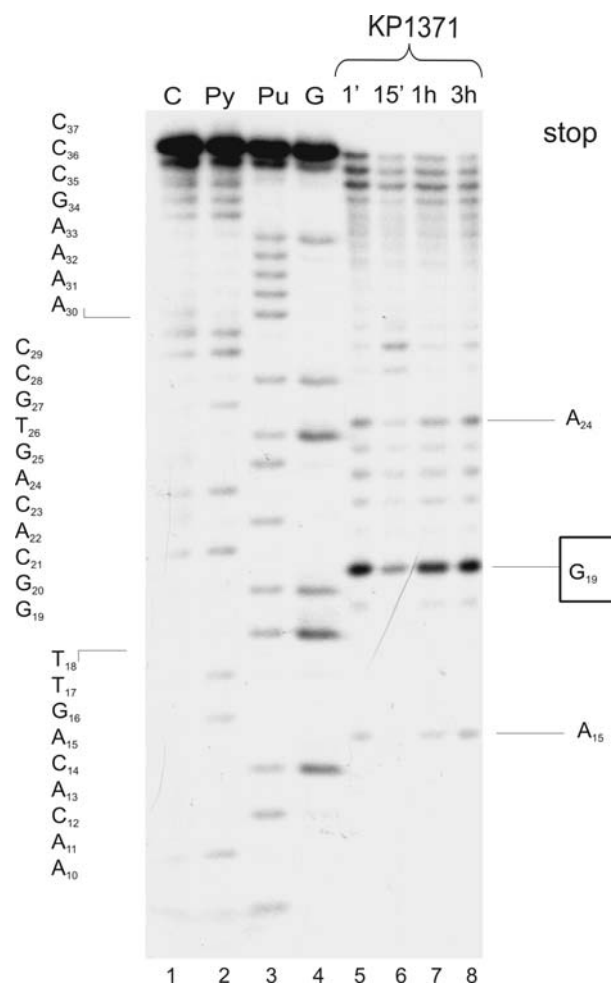
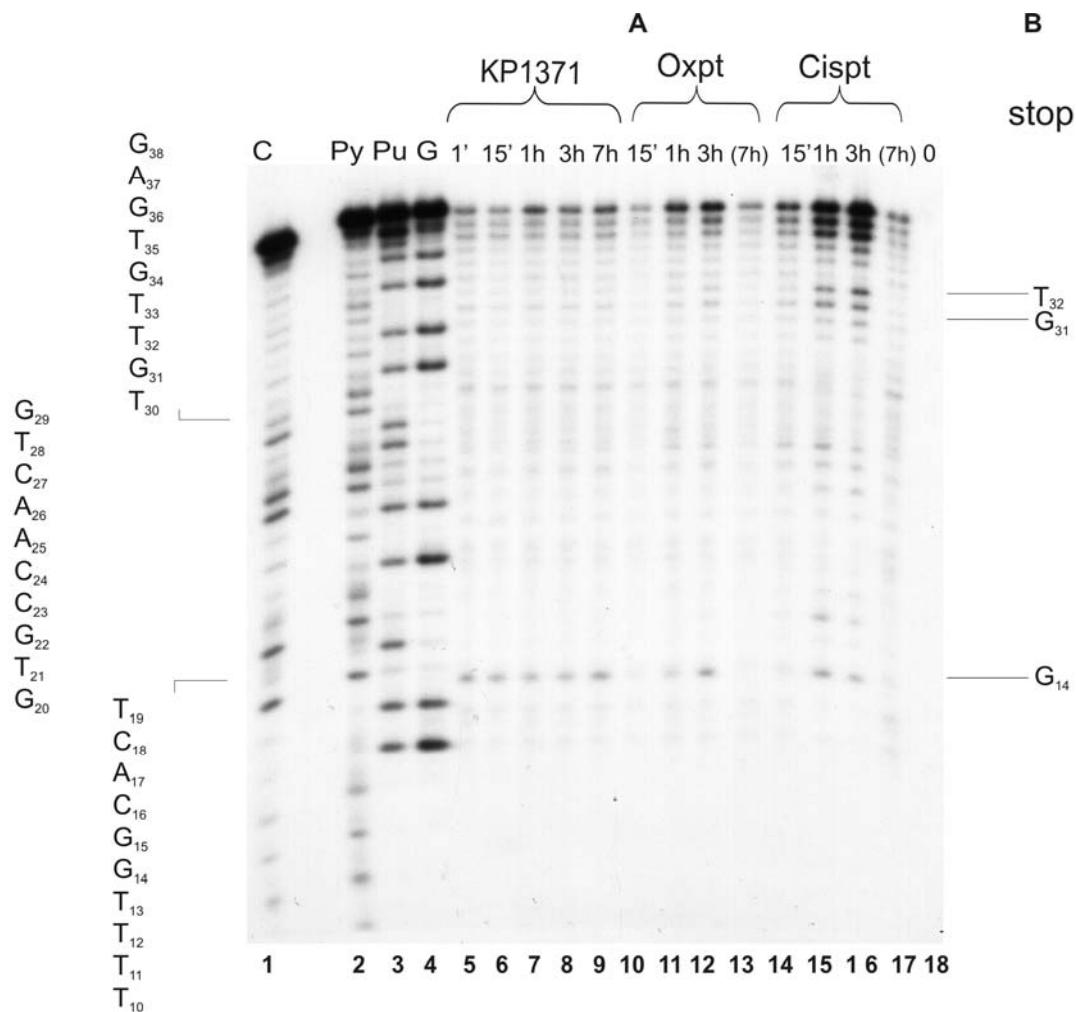


Abb. 17: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte der Interaktion von Oligonukleotid **L2L1** (L2 Strang 5' radioaktiv endmarkiert) und Plasmid dspTZ18u (Bild nicht gezeigt) mit 60 μ M KP1371 (Bahn 5-8), für die angegebenen Zeitpunkte nach enzymatischem Abbau durch T4 DNA-Polymerase und Auftrennung in einem denaturierenden 12% Harnstoff-Polyacrylamidgel. C = Cytosin Sequenz Leiter, Py = Pyrimidin Sequenzleiter, Pu = Purin Sequenzleiter, G = Guanin Sequenzleiter. Die Koordinaten der DNA-Basen sind am linken Rand angegeben, die identifizierten Stoppstellen („stop“) der T4 DNA-Polymerase am rechten Rand.

2.2 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, L1L2

Zur Bestimmung der Nukleotidbindungsstellen des Gegenstrangs L1 wurde analog zur Kartierung des L2L1 Oligonukleotids jede der untersuchten Verbindungen mit dem entsprechenden Oligonukleotid L1L2 in Anwesenheit von Plasmid inkubiert und nach verschiedenen Inkubationszeiten das Modifikationsmuster bestimmt (Abb. 18). Auch für diesen Strang konnte für KP1371 ein sich über die Zeit nicht mehr veränderndes Signalmuster im Gegensatz zu Oxaliplatin und Cisplatin beobachtet werden. Eine der Hauptmodifikationsstellen für KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin ist das Guanin an Positionen 14. Für Cisplatin konnte für die längeren Inkubationszeiten weitere Platinierungsstellen, nämlich ein Thymin an Position 32 sowie ein Guanin an Position 31, identifiziert werden. Da das Oligonukleotid beim Zeitpunkt 7 h der Inkubation mit Oxaliplatin und Cisplatin eine Übermodifizierung erfahren hat, und daher zum größten Teil nicht mehr in das Gel einlaufen konnte (sichtbar im oberer Abschnitt des Gels; hier nicht gezeigt), muss hier auf eine detaillierte Auswertung dieses Zeitpunktes verzichtet werden.



5'-GAT CCT CAC AAC ACA GTT GGC ACA GTG CCA AAA GCC CT-3'
 3'-GGA GTG TTG TGT CAA CCG TGT CAC GGT TTT CGG GAG ATC-5'

C

Abb. 18 **A**: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte der Interaktion von Oligonukleotid **L1L2** (L1 Strang 5' radioaktiv endmarkiert) in Anwesenheit von Plasmid dspTZ18u (Bild nicht gezeigt) mit 60 μ M KP1371 (Bahnen 6-9), 60 μ M Cisplatin (Bahnen 10-13) oder 60 μ M Oxaliplatin (Bahnen 14-17) für die angegebenen Zeitpunkte nach enzymatischem Abbau durch T4 DNA-Polymerase und Auftrennung in einem denaturierenden 12% Harnstoff-Polyacrylamidgel. 0 = nicht modifiziertes L1L2 Oligonukleotid, C = Cytosin Sequenz Leiter, Py = Pyrimidin Sequenzleiter, Pu = Purin Sequenzleiter, G = Guanin Sequenzleiter. Die Koordinaten der DNA Basen sind am linken Rand angegeben. **B**: Identifizierte Stoppstellen („stop“) der T4 DNA-Polymerase und die daraus resultierenden Modifikationsstellen („mod“) der Verbindungen. **C**: Hauptanbindungsstelle von KP1371.

2.3 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Massentitration, L2L1

In diesem Abschnitt sollte die Frage beantwortet werden, wie sich die Modifikationsstellen der untersuchten Verbindungen *bei gleichem Ausmaß an induzierten DNA-Sekundärstrukturveränderungen* unterscheiden. Diese Untersuchung sollte kinetische Effekte der detektieren Sequenzspezifität von KP1371 ausschließen. Dazu wurden die Konzentrationen von KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin ermittelt, die vergleichbare Veränderungen der Sekundärstruktur eines Plasmids hervorrufen. Der Koaleszenzpunkt (= superzirkuläre und offenzirkuläre Plasmidform laufen deckungsgleich im Agarosegel) wurde bei KP1371 mit einer Konzentration von 180 μM , bei Oxaliplatin mit 1600 μM und bei Cisplatin mit 120 μM erreicht.

Anhand der ermittelten Konzentrationen wurde in Anwesenheit des Oligonukleotids L2L1 und Plasmid eine Massentitration der 3 Verbindungen durchgeführt (s. Abb. 19). Unter diesen Bedingungen sieht man nun auch für KP1371 eine Zunahme der Signalintensität, wobei sich das Signalmuster der untersuchten Platinverbindungen signifikant voneinander unterscheidet. Die Massentitration bestätigte das Guanin an Position 19 als Hauptplatinierungsstelle des Platin(II)-Biphosphonat Komplexes. Bei zunehmender Substanzmenge kamen noch schwache Nebensignale hinzu, die die Modifikationen der Positionen T26 und G27 repräsentieren. Diese hinzukommenden modifizierten Basen erklären, dass man unter den Bedingungen einer Massentitration für KP1371 eine Zunahme der DNA-Sekundärstrukturveränderungen detektieren kann, die bei den Bedingungen einer Kinetik nicht induzierbar waren. Dies ist auf ein anderes thermodynamisches Gleichgewicht zurückzuführen.

Entsprechend der Kinetikuntersuchungen ist auch für Oxaliplatin das Guanin an Position 19 eine der bevorzugten Bindungsstellen in dem untersuchten Oligonukleotid, wobei bei den ermittelten Konzentrationen die Stellen A24 und A15 mit vergleichbarer Affinität platinieren werden konnten. Im Gegensatz zu KP1371 und Oxaliplatin konnte Cisplatin in Übereinstimmung mit den vorangegangenen Untersuchungen das Adenin an Position 24 mit einer entsprechend hohen Affinität modifizieren. Weitere Signale mit schwächerer Intensität konnten als platinisiertes Adenin an den Positionen 15 und als platinisiertes Guanin an Position 19 identifiziert werden.

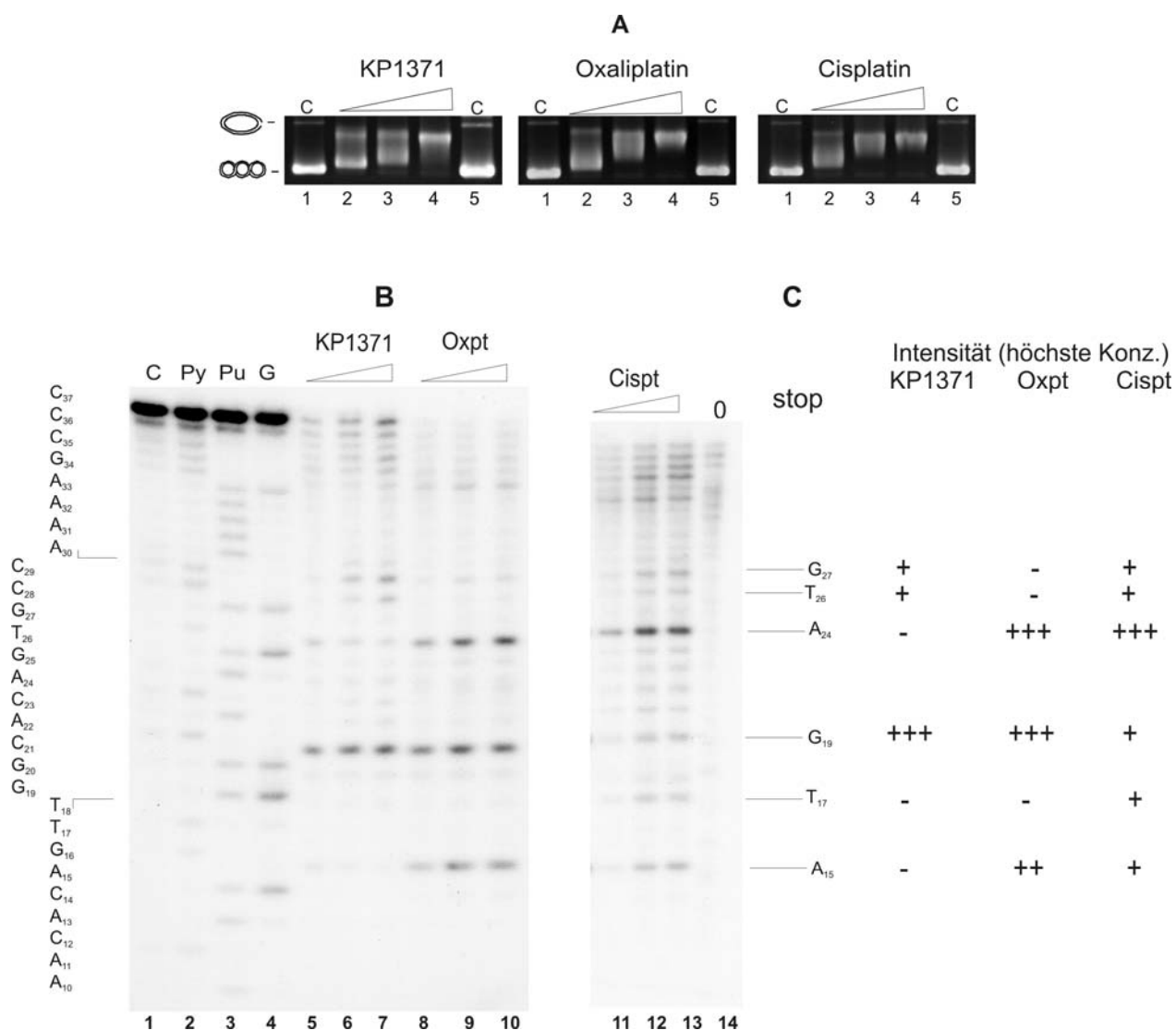


Abb. 19: Analyse der Inkubation (1 h/37°C) von Oligonukleotid **L2L1** (L2 Strang 5' radioaktiv endmarkiert) in Anwesenheit von Plasmid dspTZ18u mit steigenden Mengen an KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin. **A:** Auftrennung der Reaktionsprodukte nach Inkubation und vor T4 DNA-Polymerase Reaktion in einem Agarosegel (EtBr gefärbt): C: Kontroll Plasmid, KP1371 Bahnen 2-4: 120 µM, 160 µM, 180 µM; Oxaliplatin Bahnen 2-4: 800 µM, 1200 µM, 1600 µM; Cisplatin Bahnen 2-4: 60 µM, 100 µM, 120 µM. **B:** Autoradiogramm der Reaktionsprodukte der Inkubation von Oligonukleotid **L2L1** mit den entsprechenden Konzentrationen von KP1371, Oxaliplatin oder Cisplatin nach enzymatischem Abbau der DNA durch T4 DNA-Polymerase und Auftrennung in einem denaturierenden 12% Harnstoff-Polyacrylamidgel. C = Cytosin Sequenz Leiter, Py = Pyrimidin Sequenzleiter, Pu = Purin Sequenzleiter, G = Guanin Sequenzleiter. Die Koordinaten der DNA-Basen sind am linken Rand angegeben. Bahn 14 (0) = nicht modifiziertes L2L1 Oligonukleotid. **C:** Identifizierte Stoppstellen („stop“) der T4 DNA-Polymerase und deren Intensitätsvergleich.

Um einen Überblick über die unterschiedlichen Verteilungsmuster der Stoppsignale bei der T4 DNA-Polymerase-Kartierung der Verbindungen zu erhalten, wurde für die jeweils höchste Konzentration, die bei der Massentitration verwendet wurde, die Intensitätsverteilung grafisch dargestellt (s. Abb. 20). Diese Konzentration entspricht den jeweiligen Koaleszenzpunkten der Verbindungen bei der Analyse der DNA-Sekundärstrukturveränderungen (s. Abb. 19 A).

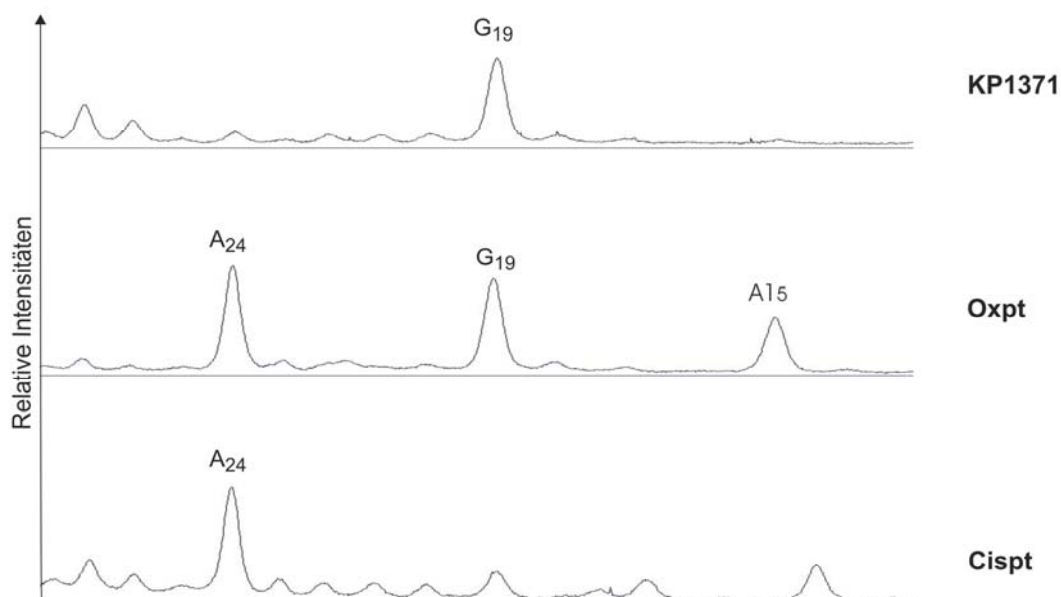


Abb. 20: Modifikationsprofil von KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin für das Oligonukleotid L2L1. Zur Ermittlung der Intensitäten wurde die Bahn mit der höchsten Konzentration an Verbindung eingescannt und die relativen Intensitäten grafisch dargestellt (Programm: ImageJ).

Anhand dieser Verteilung lässt sich folgender Schluss ziehen: KP1371 zeigt in Bezug auf seine bevorzugte Bindungsstelle am Guanin G19 unter diesen Bedingungen eine Übereinstimmung mit Oxaliplatin. Die weiteren, für Oxaliplatin spezifischen und starken Signale stellen für KP1371 nur schwache Nebensignale dar. Die Base Adenin an der Stelle 24 des L2L1 Oligonukleotids konnte als eine weitere bevorzugte Bindungsstelle für Oxaliplatin und Cisplatin identifiziert werden. Diese fehlt für KP1371 praktisch ganz.

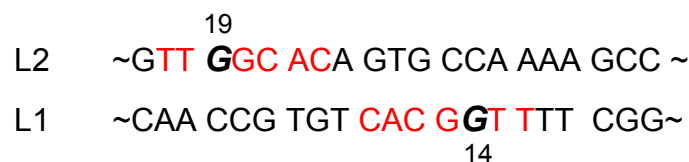
Die Hauptsignale von KP1371 und Cisplatin zeigten keine Übereinstimmung, sie waren fast vollständig komplementär. Wie von der chemischen Struktur vielleicht zu erwarten war, ähnelt KP1371 zwar in wenigstem einem Hauptsignal der Verbindung Oxaliplatin; aber auch hier lassen sich signifikante Unterschiede feststellen: Während

Oxaliplatin unter den Bedingungen der Massentitration auch die Adenine A24 und A15 platinieren konnte, zeigte KP1371 praktisch keine Modifikationstendenzen gegenüber diesen Basen.

Die oben aufgestellte Arbeitshypothese, dass KP1371 eine sofortige und auch selektive Basenmodifikation hervorruft, hat sich also bestätigt und reflektiert somit die Ergebnisse der DNA-Sekundärstruktur Experimente.

2.4 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, KMfw

Für das untersuchte Oligonukleotid L2L1 konnte unter den gewählten Bedingungen je ein prominentes Signal für KP1371 pro Strang identifiziert werden. Interessanterweise entsprechen sich die jeweiligen platinieren Basen in Bezug auf ihre Umgebung. Es scheint, dass KP1371 *sofort*, im Gegensatz zu Oxaliplatin und Cisplatin, Guanine innerhalb eines bestimmten Sequenzmusters modifizieren kann. Dieses Muster (rot) ist zweimal im untersuchten Oligonukleotid enthalten, wobei das zentrale Guanin je einmal in Strang L2 (Modifikation von G19) und einmal im komplementären Strang L1 (Modifikation von G14) enthalten ist:



Auch Oxaliplatin und Cisplatin können die Guanine in diesem Motiv im Prinzip modifizieren, allerdings zeigte Cisplatin eine deutlich geringere Affinität gegenüber dem Guanin 19 im Vergleich zu KP1371; und Oxaliplatin modifizierte G19 mit einer Stärke, die *erst nach siebenstündiger Inkubation* zu der von KP1371 vergleichbar war (Abb. 16).

Um weitere experimentelle Evidenz für die anscheinende Sequenzspezifität von KP1371 zu erhalten, wurde im nächsten Schritt das KMfw Oligonukleotid verwendet, welches die Sequenz „TTGGCAC“ an anderen Stellen enthält (Sequenzen der Oligonukleotide L2L1 und KMfw im Vergleich siehe Abb. 21).

A

19
 5'-GAT CCT CAC AAC ACA GTT **GGC ACA** GTG CCA AAA GCC CT-3'
 3'-GGA GTG TTG TGT CAA CCG TGT **CAC GT** TTT CGG GAG ATC-5'
14

B

13 25
 5'-CT CAT GTG ACT **TGG CAC** TCA AGT **TGG CAC** CCT GAC TGA C-3'
 3'-GTA CAC TGA ACC GTG AGT TCA ACC GTG GGA CTG ACT GGA-5'

Abb. 21: Sequenz des L2L1- (A) und des KMfw-Oligonukleotids (B).

Die Modifikationsstellen von KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin auf dem KMfw-Oligonukleotid wurden mittels einer Massentitration ermittelt. Dabei wurden die gleichen Modifikationsbedingungen wie für die Massentitration des L2L1-Oligonukleotids verwendet.

Die experimentellen Ergebnisse sind in Abb. 22 gezeigt. Zur besseren Veranschaulichung der Unterschiede der Nukleotidanbindung von KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin wurden die Signalintensitäten in Abb. 23 zusätzlich grafisch dargestellt.

Wie in beiden Abbildungen ersichtlich ist, konnten für KP1371 die Guanine an den Positionen 13 und 25 als Hauptintensitätssignale ermittelt werden. Diese Guanine befanden sich tatsächlich wieder innerhalb des Musters „TTGGCAC“, das als entscheidend für die Sequenzspezifität angenommen wurde (Ein Signal mit einer schwächeren Intensität konnte einem Adenin an der Position 21 zugeordnet werden.) Für Oxaliplatin konnten die gleichen Nukleotide als Anbindungsstellen identifiziert werden, allerdings unterschieden sie sich in ihrer Signalstärke von KP1371. Die im Bindungsmotiv enthaltenen Guanine werden von Oxaliplatin etwas schwächer modifiziert, dafür zeigte das Adenin an Position 21 eine etwas höhere Signalstärke im Vergleich zu KP1371. Erstaunlicherweise konnten für Cisplatin nur sehr schwach ausgeprägte Signale und keine präferentiellen Modifikationsstellen identifiziert werden, obwohl die DNA-Sekundärstrukturveränderungen bei allen drei Verbindungen vergleichbar waren. G13 und A21 können von Cisplatin im Vergleich zu KP1371 und Oxaliplatin nicht modifiziert werden, G25 zeigte nur ein äußerst schwaches Signal.

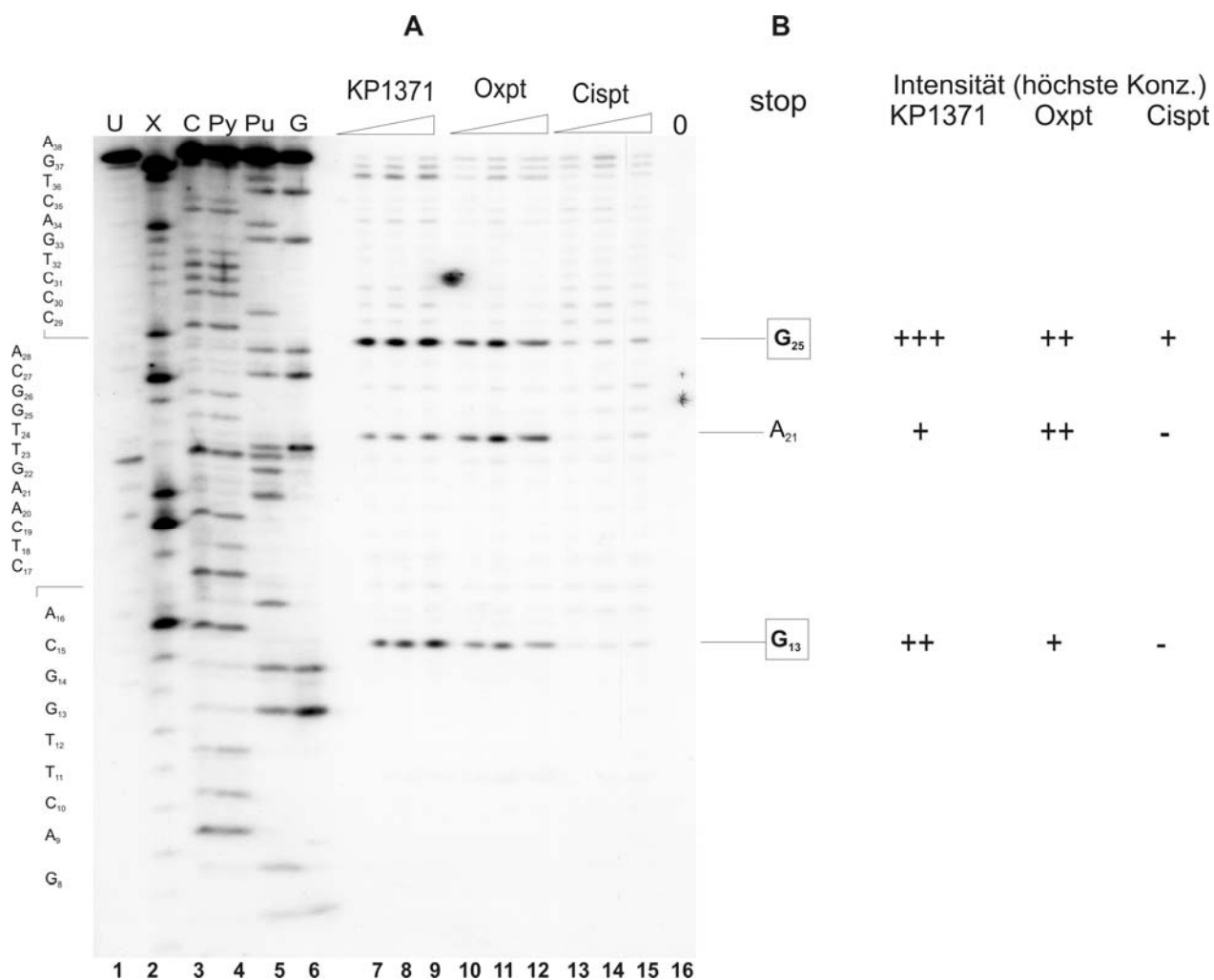


Abb. 22: Analyse der Inkubation (1 h/37°C) von Oligonukleotid **KMfw** („obere“ Strang 5' radioaktiv endmarkiert) in Anwesenheit von Plasmid dspTZ18u (Bilder nicht gezeigt) mit steigenden Mengen an KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin. **A**: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte nach enzymatischen Abbau der DNA durch T4 DNA-Polymerase und Auftrennung in einem denaturierenden 12% Harnstoff-Polyacrylamidgel. KP1371, Bahn 7: 120 µM, Bahn 8: 160 µM, Bahn 9: 180 µM; Oxaliplatin, Bahn 10: 800 µM, Bahn 11: 1200 µM, Bahn 12: 1600 µM und Cisplatin, Bahn 13: 60 µM, Bahn 14: 100 µM, Bahn 15: 120 µM. Bahn 16 (0) = nicht modifiziertes KMfw-Oligonukleotid. C = Cytosin Sequenz Leiter, Py = Pyrimidin Sequenzleiter, Pu = Purin Sequenzleiter, G = Guanin Sequenzleiter; U = nicht behandeltes MKfw-Oligonukleotid; X: G = Guanin Sequenzleiter des L2L1-Oligonukleotids. Die Koordinaten der DNA-Basen sind am linken Rand angegeben. **B**: Identifizierte Stoppstellen („stop“) der T4 DNA-Polymerase und deren Intensitätsvergleich.

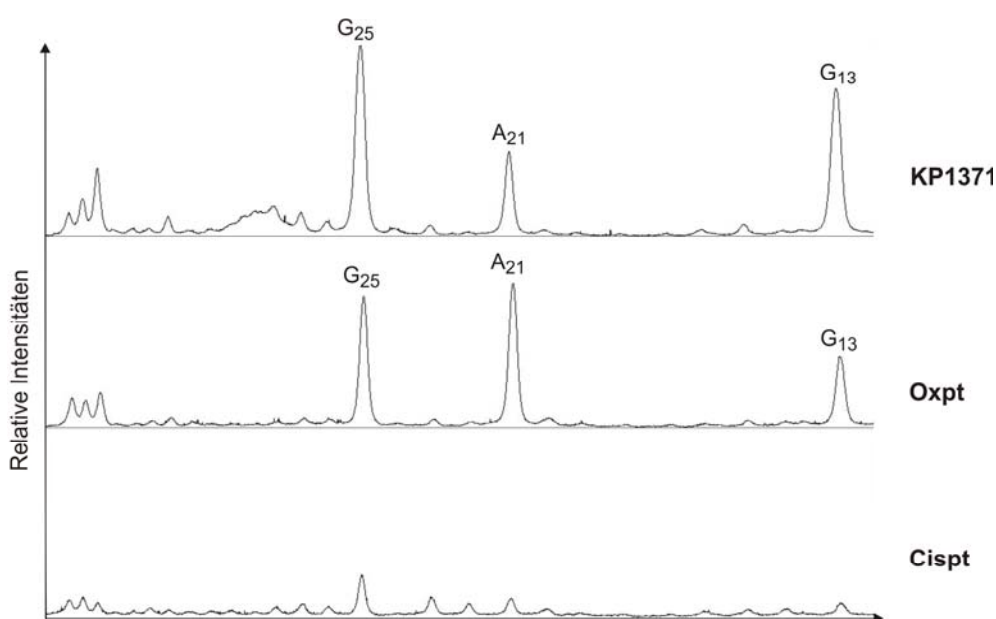


Abb. 23: Modifikationsprofil von KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin für das Oligonukleotid KMfw. Zur Ermittlung der Intensitäten wurde die Bahn mit der höchsten Konzentration an Verbindung eingescannt und die relativen Intensitäten grafisch dargestellt (Programm: ImageJ).

2.5 Sequenzspezifität von KP1371: Modifikationskartierung mit T4 DNA-Polymerase, Kinetikuntersuchung, 177 bp DNA-Fragment

Um die Frage beantworten zu können, ob die bevorzugte Anbindung von KP1371 an bestimmte Guanine auf das oben beschriebene Bindungsmotiv beschränkt ist, wurden die Anbindungsstellen von KP1371, Oxaliplatin und Cisplatin auf einem DNA-Fragment untersucht, welches das Motiv „TTGGCAC“ nicht enthielt. Für diese Untersuchung wurde ein einseitig radioaktiv markiertes 177 bp DNA-Fragment verwendet und die Modifikationsstellen in einem Kinetik-Experiment bestimmt. Der mit der Maxam-Gilbert Sequenzierung zu lesende Bereich und die identifizierten Anbindungsstellen sind in Abb. 24 dargestellt. Bei diesem DNA-Fragment können nur geringfügige Unterschiede der modifizierten Basen durch KP1371, Oxaliplatin, oder Cisplatin festgestellt werden. Eine genaue Zuordnung der Basen im oberen Bereich des Gels ist aber schwierig, da die Auflösung der Methode hier nicht ausreichend ist. Das Ergebnis der T4-Kartierung des 177 bp DNA-Fragments deutet darauf hin, dass die mit den Oligonukleotiden L2L1 und KMfw identifizierte Basensequenz „TTGGCAC“ für die Sequenzunterschiede der Verbindungen Cisplatin, Oxaliplatin und KP1371 mit verantwortlich sein könnte. Man kann vorläufig davon ausgehen,

dass für die präferentielle Modifizierung eines Guanins durch KP1371 in diesem Muster die flankierenden Basen, oder wenigstens ein Teil davon notwendig sind.

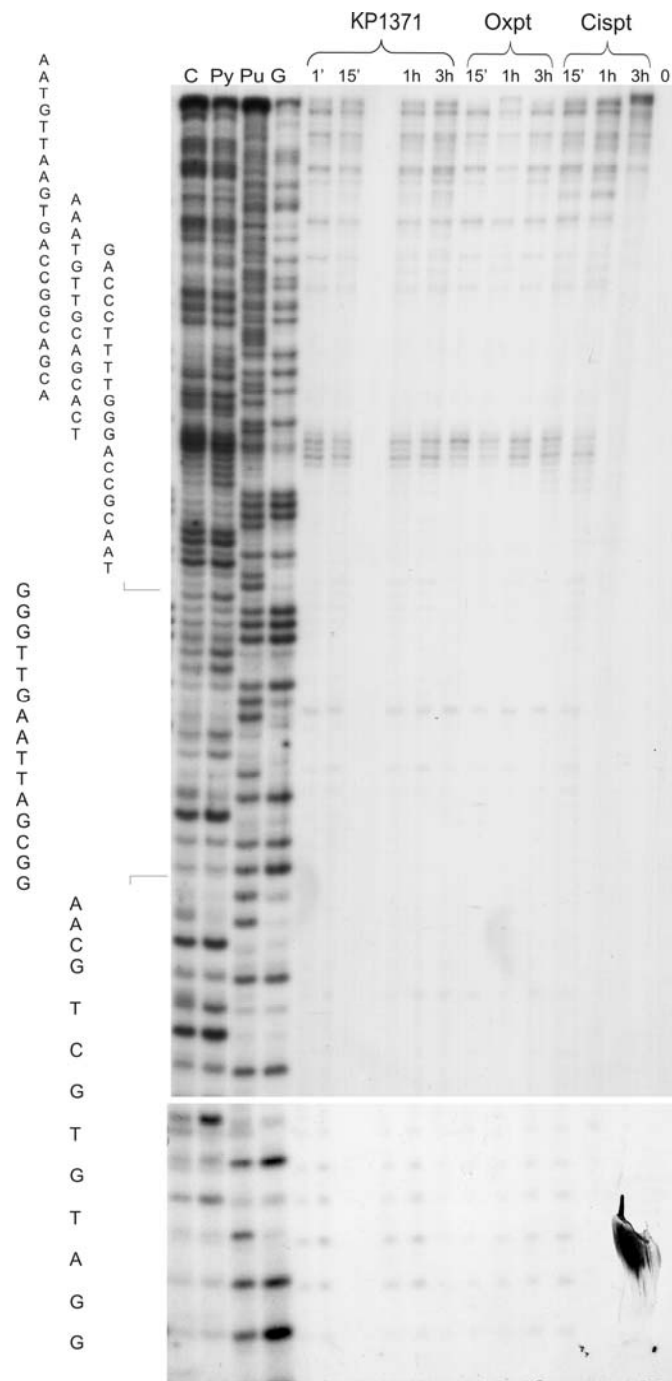


Abb. 24: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte der Interaktion von Plasmid dspTZ18u (Bilder nicht gezeigt) und 177 bp DNA-Fragment („oberer“ Strang 5' radioaktiv endmarkiert) mit 60 μ M KP1371, 60 μ M Cisplatin oder 60 μ M Oxaliplatin für die angegebenen Zeitpunkte nach enzymatischem Abbau durch T4 DNA-Polymerase und Auftrennung in einem denaturierenden 12% Harnstoff-Polyacrylamidgel (Plasmid nicht sichtbar). 0 = nicht modifiziertes 177 bp DNA-Fragment; C = Cytosin Sequenz Leiter, Py = Pyrimidin Sequenzleiter, Pu = Purin Sequenzleiter, G = Guanin Sequenzleiter. Die Koordinaten der DNA-Basen sind am linken Rand angegeben.

3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Fähigkeit der Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe mit DNA zu reagieren und Strukturveränderungen hervorzurufen, war im Allgemeinen sehr gering. Nur hohe Komplexkonzentrationen von KP1363 und KP1370 konnten die DNA Aufdrillen und Verbiegen, was für die Ausbildung von mono- und bifunktionalen Addukten mit der DNA spricht. Diese Adduktbildung konnte durch die Zugabe von Calcium nicht beeinflusst werden. Auch für die Komplexe KP1364, KP1371 und KP735 konnte anhand der Plasmidmigration im Agarosegel ein Biegen und Aufdrillen der DNA identifiziert werden. Die Analyse des Laufverhaltens eines DNA-Fragments im Polyacrylamidgel ergab eine etwas höhere Reaktivität dieser Komplexe gegenüber DNA im Vergleich zu KP1363 und KP1370. Calciumzugabe führte im Fall der DACH-Komplexe KP1364 und KP1371 zu einer geringfügig höheren Effizienz in der Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturveränderungen, nicht aber beim Cisplatinderivat KP735. Die nicht detektierte bzw. äußerst geringe Aktivierung der Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe in Anwesenheit von Calcium ist in Übereinstimmung mit ihrer geringen Zytotoxizität in vitro (s. Tab. 7). Die Untersuchungen der in vitro Zytotoxizität erfolgt in handelsüblichen Zellkulturmedien, die calciumhaltig sind. Wenn tatsächlich diese Komplexe unter Calciumeinfluss eine Aktivierung erfahren würden, müsste die in vitro Zytotoxizität höher sein.

Die Untersuchungen anderer Autoren von KP735 und den R,S-Derivaten von KP1364 und KP1371 gegenüber dGpG zeigten in Abwesenheit von Calcium eine nur geringe Reaktivität gegenüber dem Dinukleotid. Für KP735 bestätigte sich diese Beobachtung auch mit Kalbsthymus-DNA und dGMP. Allerdings konnte hier in Gegenwart von Calcium eine beschleunigte Anbindung der Verbindungen an DNA-Basen beobachtet werden, was im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen steht [105-107]. Für diese Unterschiede kann im Moment keine sinnvolle Erklärung angeboten werden. Allerdings stellt der untersuchte Zeitraum für die Anbindung an dGpG eine wesentliche Abweichung zu dem in dieser Arbeit gewählten dar. Ein signifikanter Unterschied der Anbindung in An- und Abwesenheit von Calcium zeigte sich erst ab einer Inkubationszeit von 100 h [106]. Wir vermuten deshalb, dass die hohe in vivo Aktivität der Verbindungen auf die beobachtete Akkumulation und nicht auf eine signifikante Calcium-Aktivierung zurückzuführen ist.

Für KP1364, KP1371 und KP735 konnte ein ungewöhnlicher Reaktionsmodus gegenüber DNA festgestellt werden: Nach einer schnellen Initialreaktion (≤ 1 St.) wurde ein thermodynamisches Reaktionsgleichgewicht erreicht, das bei den vorliegenden Edukt-Konzentrationen trotz längerer Inkubation nicht mehr signifikant verändert wurde.

Die Annahme, dass dieses Verhalten des Komplexes auf eine ausgesprochene Sequenzspezifität zurückgeführt werden könnte, wurde mit der T4 DNA-Polymerase-Kartierungstechnik untersucht. Mit dem Oligonukleotid L2L1 konnte gezeigt werden, dass tatsächlich die bevorzugte Modifizierung von bestimmten Basen dieses Verhalten begründen könnte. Nicht nur die bevorzugte und sofortige Reaktion bestimmter Basen wurde beobachtet, sondern auch im Vergleich zu Cisplatin und Oxaliplatin ein *unterschiedliches Muster* der modifizierten Basen. Interessanterweise zeigte die Kartierung des Gegenstrangs des L2L1 Oligonukleotids, dass das auf diesem Strang von KP1371 modifizierte Guanin (**G**) von der gleichen Basenfolge flankiert wird, wie auf dem untersuchten komplementären Strang (Motiv: TT**G**GCAC). Um festzustellen, ob diese Modifikation innerhalb einer bestimmten Sequenz ein rein zufälliger Effekt war, oder ob tatsächlich diese Basenumgebung ausschlaggebend für die Fähigkeit von KP1371 ist, das Guanin innerhalb dieser Sequenz zu modifizieren, wurde ein Strang eines weiteren Oligonukleotids (KMfw) untersucht, welches dieses Motiv an anderen Stellen enthielt. Für KP1371 und Oxaliplatin konnte gezeigt werden, dass diese Komplexe unter der Bedingung einer Massentitration wiederum bevorzugt das Guanin im Bindungsmotiv binden konnten, was mit den Untersuchungen des L2L1 Oligonukleotids übereinstimmte. Im Gegensatz dazu konnte Cisplatin Basen in dem Oligonukleotid KMfw nur zu einem sehr geringen Ausmaß modifizieren. Als weitere Kontrolle wurde die Anbindung der Komplexe an ein 177 bp DNA-Fragment untersucht, welches die Sequenz des Motivs nicht enthielt. In Form einer Kinetikuntersuchung konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Oxaliplatin, Cisplatin und KP1371 identifiziert werden. Dies bestätigte die angenommene Basenspezifität der Verbindung.

Bei der Massentitration der Verbindungen in Gegenwart der Oligonukleotide L2L1 oder KMfw in Anwesenheit von Plasmid zeigte sich, dass bis zum Erreichen des Koaleszenzpunktes Oxaliplatinkonzentrationen von 1600 μM benötigt wurden, im Gegensatz zu 180 μM KP1371 und 120 μM Cisplatin. Das bedeutet, dass unter den gewählten Bedingungen, KP1371 und Cisplatin eine wesentlich höhere Fähigkeit als

Oxaliplatin haben, die DNA-Sekundärstruktur zu beeinflussen. Die Beobachtung dass zum Erreichen vergleichbarer DNA-Modifikationsgrade eine wesentlich höhere Oxaliplatin- als Cisplatinkonzentration benötigt wird ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen [109,110]. Um ähnliche Strukturveränderungen der DNA hervorzurufen, wurden für KP1371 und Cisplatin vergleichbare Konzentrationen ermittelt. Dies würde eigentlich auf eine ähnliche Reaktivität der beiden Verbindungen gegenüber DNA hinweisen. Aber wie in den Kinetikuntersuchungen gezeigt wurde, verhalten sich die beiden Komplexe grundsätzlich unterschiedlich: Für Cisplatin konnte bei den Kinetikuntersuchungen der DNA-Strukturveränderungen (s. Abb. 16) eine kontinuierliche Zunahme der Strukturveränderungen beobachtet werden, wohingegen KP1371 unter den gewählten Bedingungen der Kinetikuntersuchungen nach sofortiger Reaktion mit DNA keine weiteren Veränderungen des Laufverhaltens des Plasmids zeigte. Dieses Verhalten von KP1371 im Vergleich zu Cisplatin und Oxaliplatin lässt auf einen grundsätzlich anderen Reaktionsmodus gegenüber DNA schließen.

Bei allen Untersuchungen zeigte sich dass, wie zu erwarten war (s. Einleitung), alle untersuchten Verbindungen Purine bevorzugen [111,112]. Bemerkenswert ist eine geringe aber doch vorhandene Affinität der Verbindungen gegenüber Pyrimidinen. Dies ist aber in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen [113].

Im Gegensatz zu den hier gezeigten Untersuchungen mit den Oligonukleotiden L2L1 und KMfw, die beide das Motiv TTGGCAC enthalten, konnte für Oxaliplatin in Untersuchungen anderer Autoren keine signifikant anderen Anbindungsstellen auf der DNA im Vergleich zu Cisplatin identifiziert werden [110]. Die Prüfung der verwendeten DNA-Sequenzen von mir ergab allerdings, dass die Basenfolge des oben erwähnten Motivs nicht enthalten war. Wie bei den hier vorliegenden Analysen aber gezeigt wurde, kann auch Oxaliplatin, wenn auch bei vergleichsweise hohen Konzentrationen (Massentitration) oder entsprechend hoher Inkubationsdauer (Kinetikuntersuchung) im Vergleich zu KP1371, bevorzugt das Guanin in dem identifizierten Bindungsmotiv modifizieren, nicht aber Cisplatin.

Die hohe antitumorale Wirkung der Platin(II)-Bisphosphonat Komplexe konnte bis jetzt mit der Akkumulation der Verbindungen am Knochen erklärt werden. Die hier vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass der für KP1371 gefundene ungewöhnliche Reaktionsmodus gegenüber DNA und die damit verbundene Sequenzspezifität, auch mit ein Grund für die hohe antitumorale Wirksamkeit der

Phosphonatverbindungen in diesem Organ sein könnte. Verschiedene Addukte der DNA werden auch unterschiedlich prozessiert, was eine andere biologische Aktivität im Vergleich zu Cisplatin bedeuten würde. Dieser abweichende Wirkungsmechanismus könnte somit für die Entwicklung neuer Platinkomplexe von Bedeutung sein.

Ob die Eigenschaft von KP1371 bestimmte DNA-Basen zu modifizieren, universell für alle Platin(II)-Biphosphonate gilt, müssen Analysen mit weiteren Vertretern der Biphosphonate zeigen. In diesem Zusammenhang wäre vor allem das Cisplatinderivat KP735 zu erwähnen, da auch diese Verbindung bei der Analyse der DNA-Strukturveränderungen einen ähnlichen Reaktionsmodus zeigte wie KP1371. Mit Hilfe dieser Verbindung könnte unterschieden werden, ob die für KP1371 detektierte Sequenzspezifität abhängig von der chemischen Struktur der bleibenden Liganden ist (Ammine im Falle des Cisplatinderivats; DACH-Gruppe im Falle von KP1371), oder ob sie alleine auf der Biphosphonat-Gruppierung beruht.

In Zukunft soll untersucht werden, welche der Basen des identifizierten Bindungsmotivs tatsächlich essentiell für die Bindung von KP1371 an das Guanin sind. Dies soll durch die Analyse entsprechender Oligonukleotide erfolgen, die nur Teile des Motivs enthalten.

II. Konzept der „trans-Aktivierung“: Platinverbindungen mit Acetoxim- und Hydroxylaminliganden

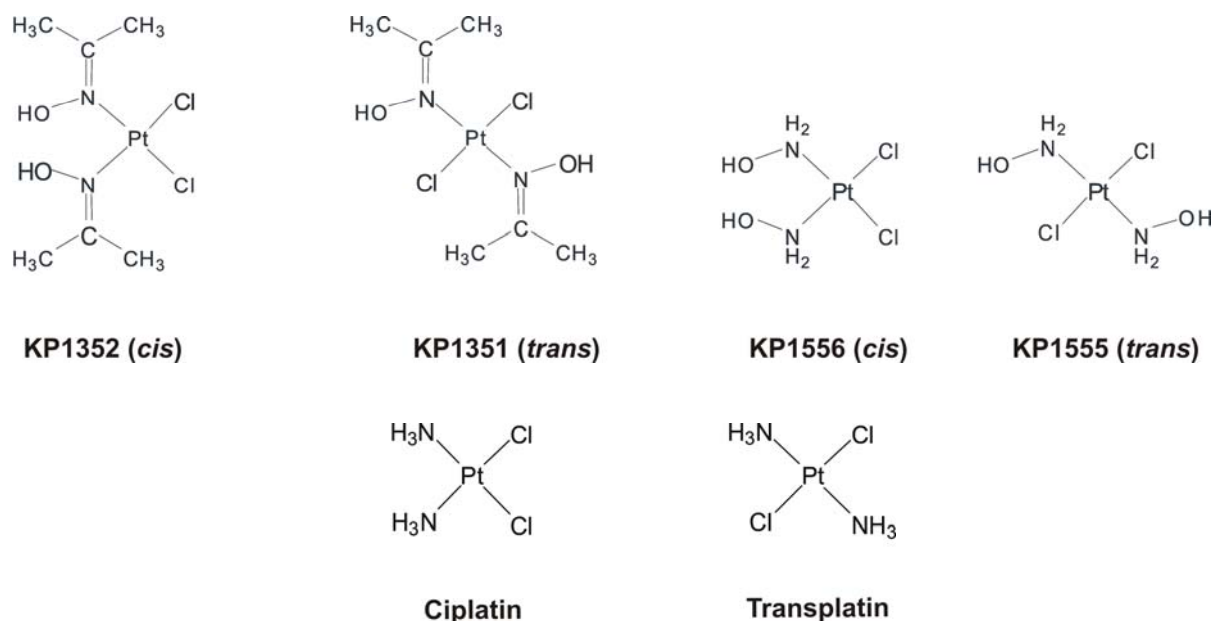


Abb. 25: Formeln der Acetoxim-Platin(II)-Komplexe KP1352 und KP1351, der Hydroxylamin-Platin(II)-Komplexe KP1556 und KP1555, sowie von Cisplatin und Transplatin.

Wie in der Einleitung angesprochen, galt lange Zeit die *cis*-Konfiguration der Fluchtgruppen in einer Platinverbindung als absolute Strukturvoraussetzung für deren zytotoxische Wirksamkeit [89]. Die Grundlage für diese Struktur-Wirkungsbeziehung legte das zytotoxisch inaktive Stereoisomer von Cisplatin, Transplatin (s. Abb. 25). Man nahm an, dass vor allem die unterschiedlich ausgebildeten Addukte mit der DNA, z.B. keine Ausbildung von 1,2-intramolekularen QV, und die daraus resultierenden Konsequenzen, wie etwa keine Maskierung der ausgebildeten Addukte durch HMGB1 Proteine und damit eine schnellere Reparatur der Addukte [22], der Grund für die Inaktivität von Transplatin aber auch von anderen *trans*-Isomeren ist.

Diese Struktur-Wirkungsbeziehung konnte mittlerweile von Farrell et al. durch die Synthese zytotoxisch aktiver Verbindungen mit *trans*-Konfiguration der Liganden widerlegt werden [90]. Allerdings gibt es bis heute keine allgemein gültige Regel, die besagt, welche Strukturvoraussetzungen aktive *trans*-Verbindungen tatsächlich erfüllen müssen, um zytotoxisch bzw. antitumoral wirksam zu sein, oder welche Addukte mit der DNA diese Wirkung vermitteln könnten. Bis jetzt konnte nur für die

folgenden Klassen von *trans*-Platin-(II)-Verbindungen eine zytotoxische Aktivität und in den untersuchten Zelllinien keine Kreuzresistenz zu Cisplatin gezeigt werden [114-118].

- 1) Platin(II)-Komplexe mit stickstoffhaltigen Heterozyklen, z.B. Thiazol oder Quinolin [119], Piperidin oder Piperazin [118].
- 2) Platin(II)-Komplexe mit Iminoether Liganden [120],
- 3) asymmetrische Pt(II)-Komplexe mit einem verzweigten aliphatischen Amin und einem sterisch wenig anspruchsvollen Amin [117].

Diese Aufzählung ist rein deskriptiv und lässt keine allgemein gültigen Regeln aufstellen. Möglicherweise gibt es noch zu wenig Vertreter der *trans*-aktiven Verbindungen, um solche Regeln zu erkennen. Um so mehr ist es deshalb nötig, nach weiteren *trans*-aktiven Verbindungen zu suchen.

In Anlehnung an die *trans*-Platin(II)-Iminoether-Komplexe der Klasse 2 wurde 2004 von Kukushkin et al [121] das Stereoisomerenpaar KP1351 (*trans*) und KP1352 (*cis*) (s. Abb. 25) synthetisiert, das Acetoximliganden als bleibende Liganden enthält. Diese Acetoximgruppe enthält wie die Platin(II)-Iminoether-Komplexe eine Azomethin-Struktureinheit (C=N). Eine Neuerung war die Einführung einer am Stickstoff gebundenen Hydroxylgruppe, die eine Stabilisierung der Wechselwirkung mit DNA über Wasserstoffbrückenbindungen gewährleisten sollte.

Auch die Verbindungen KP1555 (*trans*) und KP1556 (*cis*) stellen ein *cis/trans*-Isomerenpaar dar [122]. Allerdings weisen sie keine der oben vorgestellten Struktureigenschaften auf und sollten somit Vertreter der klassischen Struktur-Aktivitätsbeziehung in Anlehnung an Cis- und Transplatin repräsentieren. KP1556 (*cis*) und KP1555 (*trans*) unterscheiden sich von den parentalen Verbindungen Cis- und Transplatin nur durch die Substitution eines Wasserstoffatoms der beiden Aminogruppen durch eine Hydroxylgruppe, was zur Namensgebung „Hydroxylamin Komplexe“ führte.

In Vorarbeiten an der Universität Wien wurde die Zytotoxizität von KP1351, 1352, 1555, 1556, Cisplatin und Transplatin in cisplatinsensitiven Ovarienkarzinom- (CH1) und cisplatinresistenten Kolonkarzinomzellen (SW480) bestimmt [122]. Die Ergebnisse in Tabelle 8 zeigen, dass, wie erwartet, Cisplatin zytotoxisch aktiver als Transplatin in beiden Zelllinien war, wobei der Unterschied in SW 480 Zellen weniger ausgeprägt war. Die *trans*-Verbindung KP1351 ist in beiden Zelllinien um den Faktor 15 potenter als das *cis*-Isomer KP1352. Im Vergleich zu Cisplatin zeigt KP1351

(*trans*) einen ähnlichen IC_{50} Wert in CH1 Zellen. Ein deutlicher Unterschied wird in den cisplatinresistenten SW 480 Zellen sichtbar. Dies ist ein Hinweis darauf, dass KP1351 (*trans*) die Resistenzmechanismen dieser Zellen leichter als Cisplatin überwindet. Anhand dieser Zytotoxizitätsdaten lässt sich eindeutig erkennen, dass mit KP1351 die Synthese einer aktiven *trans*-Pt(II)-Verbindung gelungen ist, die in cisplatin sensitiven aber auch resistenten Zelllinien eine hohe zytotoxische Aktivität aufweist. Interessanterweise weist das entsprechende *cis*-Isomer anderer aktiver *trans*-Komplexe eine ähnlich hohe Zytotoxizität auf. Mit dem Ergebnis, dass KP1352 (*cis*) eine sehr geringe Zytotoxizität in den untersuchten Zelllinien aufweist, ist somit das erste Mal eine tatsächliche Umkehrung der klassischen Struktur-Aktivitätsbeziehung gelungen (*trans* zytotoxisch aktiver als *cis*).

Bei den Hydroxylaminkomplexen KP1555 (*trans*) und KP1556 (*cis*) ist das *cis*-Derivat zytotoxischer als das *trans*-Derivat, was die klassische Struktur-Aktivitätsbeziehung von Platinverbindungen widerspiegelt, wobei eine insgesamt geringere Aktivität der Hydroxylaminkomplexe im Vergleich zu den parentalen Verbindungen festgestellt wurde. Auch hier wurde eine Verringerung der Zytotoxizität in SW 480 Zellen deutlich, was für eine vergleichbare Resistenz zu derjenigen von Cisplatin und Transplatin spricht.

In den folgenden Analysen sollte gezeigt werden, welche Art der Strukturveränderungen der DNA und welche Art von DNA-Addukten beide Verbindungsklassen bilden, wie sich diese Veränderungen innerhalb eines Isomerenpaares und zwischen den *cis/trans*-Paaren unterscheiden und in wieweit eine Korrelation zwischen der Reaktivität gegenüber DNA, ausgebildeten Addukten, DNA-Aufdrillung und der Zytotoxizität der Verbindungen gezogen werden kann.

Verbindung	IC_{50} (μM)			
	CH1		SW480	
KP1352 (<i>cis</i>)	2.7	± 0.7	3.4	± 0.3
KP1351 (<i>trans</i>)	0.17	± 0.09	0.22	± 0.05
KP1556 (<i>cis</i>)	0.68	± 0.23	12	± 1
KP1555 (<i>trans</i>)	51	± 15	90	± 3
Cisplatin	0.14	± 0.03	3.3	± 0.4
Transplatin	15	± 2	19	± 3

Tabelle 8. Zytotoxizität der Acetoxim-Platin(II)-Komplexe KP1352 und KP1351 sowie der Hydroxylamin-Platin(II)-Komplexe KP1556 und KP1555 im Vergleich zu Cisplatin und Transplatin in zwei humanen Krebszelllinien [122].

Ergebnisse

1. DNA-Sekundärstrukturveränderungen und Reaktivität gegenüber DNA

Abbildung 26 zeigt das Ergebnis der Inkubation von Plasmid-DNA in Anwesenheit eines radioaktiv markierten DNA-Fragments und den Acetoximverbindungen KP1352 (*cis*) und KP1351 (*trans*) für 1 h bis 7 h. Beide Verbindungen führten zu einer Verlangsamung der superzirkulären Form des Plasmids und zu einer Beschleunigung der offen zirkulären Form des Plasmids im Gel. Dies bedeutet, dass KP1351 (*trans*) und KP1352 (*cis*) die DNA aufdrillen bzw. biegen können. Allerdings konnte für Verbindung KP1351 (*trans*) eine insgesamt langsamere Ausbildung der Strukturveränderungen beobachtet werden. Dies könnte zum einen durch eine geringere Aktivität der Verbindung verursacht worden sein, oder durch schwächere Veränderungen, die das Addukt an sich auf der DNA hervorruft. Wenn man die Veränderungen der Mobilität des 177 bp DNA-Fragments betrachtet, zeigte sich eine geringere Retardation des DNA-Fragments im Gel für KP1351 (*trans*) im Vergleich zu KP1352 (*cis*), sodass anzunehmen ist, dass der Grund für die weniger ausgeprägten Strukturveränderungen in einer geringeren Reaktivität gegenüber DNA liegt.

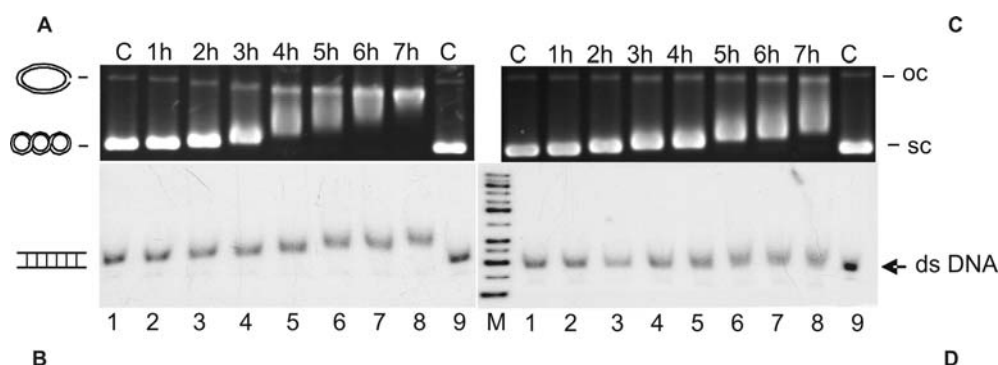


Abb. 26: **Wechselwirkung der Acetoxim-Platin(II)-Komplexe mit dsDNA.** Analyse der Inkubation von 60 μ M Verbindung KP1352 (*cis*) (A, B) bzw. KP1351 (*trans*) (C, D) mit Plasmid pTZ18u (A, C) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (B, D) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (A, C), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (B, D). Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 7 h inkubiert. M = 50 bp DNA-Leiter.

Die geringere Reaktivität von KP1351 (*trans*) gegenüber DNA wird auch durch das Ergebnis der r_B -Wert Bestimmungen über ICP-MS bestätigt: Wie in Abb. 27 zu sehen ist, zeigte KP1351 (*trans*) kleinere r_B -Werte, d.h. pro Nukleotid werden für den untersuchten Zeitraum weniger Platinatome im Vergleich zu KP1352 (*cis*) gebunden.

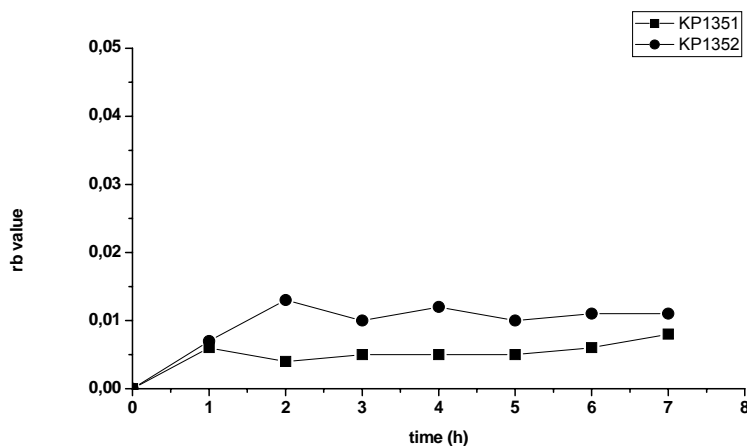


Abb. 27: Grafische Darstellung der r_B Werte für KP1351(*trans*) (■) und KP1352 (*cis*) (●) für die angegebenen Zeitpunkte.

Interessanterweise, zeigte Verbindung KP1351 (*trans*) im Vergleich zum *cis*-Isomer bei der Untersuchung der Strukturveränderungen eine geringere Beschleunigung der entspannten Form des Plasmids, wenn man die Mobilisierung dieser Plasmidform bei entsprechendem Aufdrillungsgrad der DNA vergleicht (s. Bahn 5 Abb. 26 A und Bahn 8 Abb. 26 C). Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass KP1351 (*trans*) DNA zu einem geringeren Ausmaß als KP1352 (*cis*) biegen kann.

Die Komplexe mit Hydroxylamin-Liganden als bleibende Liganden zeigen eine wesentlich ausgeprägtere Veränderung der Sekundärstruktur der DNA (Abb. 28). Bereits nach 15 Minuten für das *cis*-Derivat KP1556 und 30 Minuten für das *trans*-Derivat KP1555 sind die jeweiligen Koaleszenzpunkte, an dem offen zirkuläre und superzirkuläre Form des Plasmids deckungsgleich laufen, erreicht. D.h. beide Komplexe können ein Aufdrillen und Biegen der DNA in kürzester Zeit induzieren. Danach wird das Plasmid zu positiven Superzirkeln verdrillt, was zu einer Beschleunigung dieser Spezies im Gel führt.

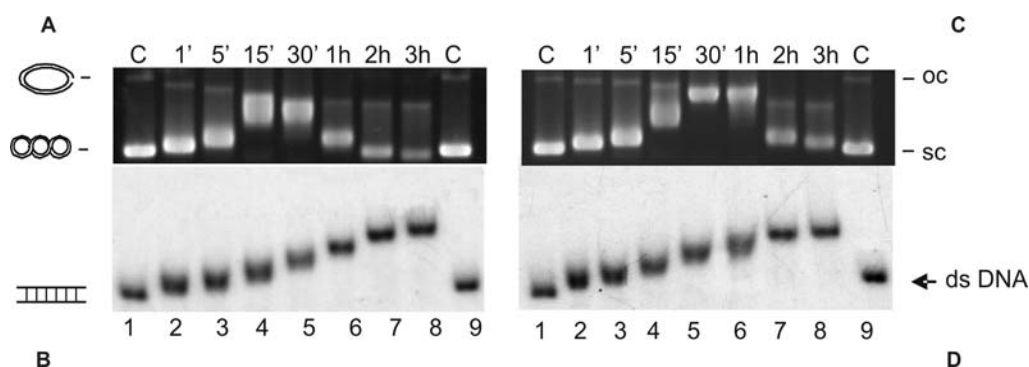


Abb. 28: **Wechselwirkung der Hydroxylamin-Platin(II)-Komplexe mit dsDNA.** Analyse der Inkubation von 60 μM Verbindung KP1556 (*cis*) (**A**, **B**) und KP1555 (*trans*) (**C**, **D**) mit Plasmid pTZ18u (**A**, **C**) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (**B**, **D**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**, **C**), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (**B**, **D**). Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 3 h inkubiert.

Diese schnelle Induzierung von DNA-Sekundärstrukturveränderungen ist begleitet von einer ausgeprägten Retardierung des 177 bp DNA-Fragments im Polyacrylamidgel, was für eine hohe Reaktivität beider Verbindungen gegenüber DNA spricht. Wie man in Abb. 29 sehen kann spiegelt sich diese hohe Reaktivität auch in den r_B -Werten wider. Hier zeigte sich, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Strukturveränderungen und der Fragmentmigration, die etwas höhere Reaktivität der *cis*-Verbindung (KP1556) im Vergleich zur *trans*-Verbindung (KP1555).

Bemerkenswerterweise, konnte bei den Untersuchungen der Strukturveränderungen auch für die Hydroxylamin-Komplexe eine weitaus geringere Beschleunigung der offen zirkulären Plasmidform im Falle des *trans*-Derivats im Vergleich zum *cis*-Derivat beobachtet werden.

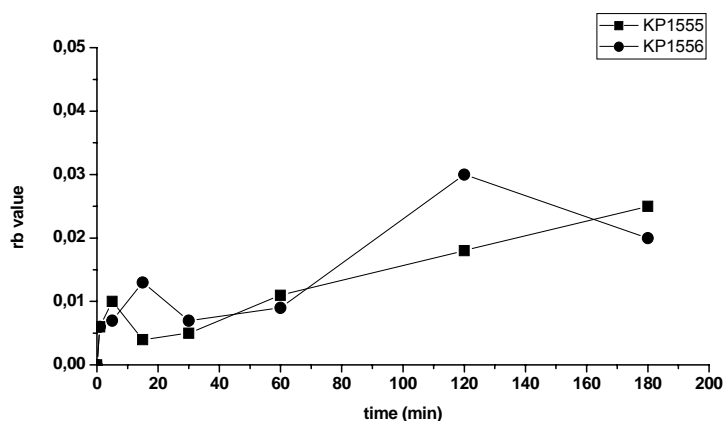


Abb. 29: Grafische Darstellung der r_B Werte für KP1555 (*trans*) (■) und KP1556 (*cis*) (●) für die angegebenen Zeitpunkte.

Die Untersuchung der Kontrollsubstanzen Cisplatin und Transplatin ergab, wie erwartet, eine Retardierung der superzirkulären und eine Mobilisierung der offenzirkulären Plasmidform, wobei Transplatin eine geringfügig höhere Effektivität zeigte (Abb. 30). Dies ist in Übereinstimmung mit der bekannten höheren Reaktivität von Transplatin, Addukte mit DNA auszubilden [114]. Auch für Transplatin, konnte wie bei den anderen *trans*-Derivaten KP1352 und KP1556 eine geringere Mobilisierung der oc-Plasmidform beobachtet werden.

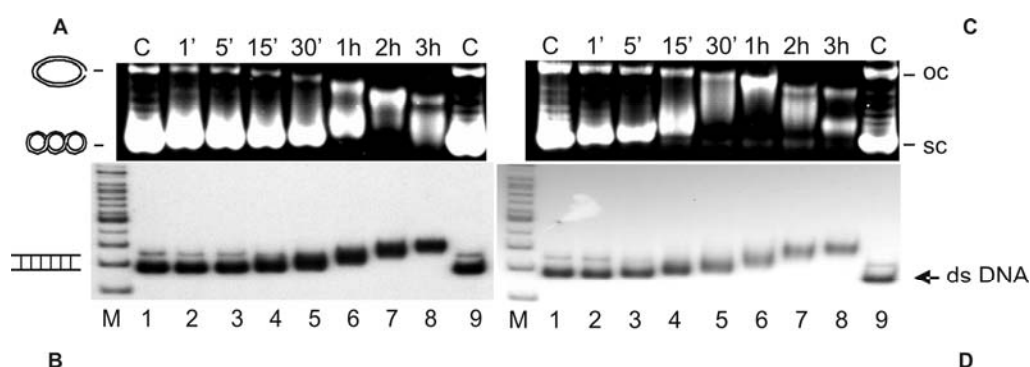


Abb. 30: **Wechselwirkung von Cisplatin und Transplatin mit dsDNA.** Analyse der Inkubation von 60 μ M Verbindung Cisplatin (A, B) und Transplatin (C, D) mit Plasmid pTZ18u (A, C) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (B, D) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (A, C), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (B, D). Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 3 h inkubiert. M = 50 bp DNA-Leiter

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich folgende Reihe der Reaktivitäten aufstellen, wobei in diesem Fall, die Effizienz der Platinierung mit dem Ausmaß der induzierten DNA-Sekundärstrukturveränderungen zusammenfällt.

KP1351 (trans) < KP1352 (cis) < Cisplatin < Transplatin < KP1555 (trans) < KP1556 (cis)

2. Untersuchung der intermolekularen Quervernetzungen (QV)

Um zu zeigen, ob die untersuchten Verbindungen in der Lage sind, mit DNA intermolekulare QV auszubilden, wurde das radioaktiv endmarkierte 177 bp DNA-Fragment mit je einer der zu analysierenden Verbindungen inkubiert und die Reaktionsprodukte in einem denaturierenden Harnstoffgel aufgetrennt. Überraschenderweise zeigten die Acetoximderivate in dem untersuchten Zeitraum keine Ausbildung von intermolekularen QV (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Untersuchung der Hydroxylaminkomplexe sind in Abb. 31 dargestellt.

Bereits nach 15 Minuten für KP1556 (*cis*) und nach 1 h Inkubation für KP1555 (*trans*) enthalten alle DNA-Moleküle mindestens eine intermolekulare QV, erkennbar durch eine neue, langsamer laufende Spezies im Gel. Eine weitere Inkubation führte durch Zunahme der intermolekularen QV zu einer Beschleunigung dieser Spezies im Gel.

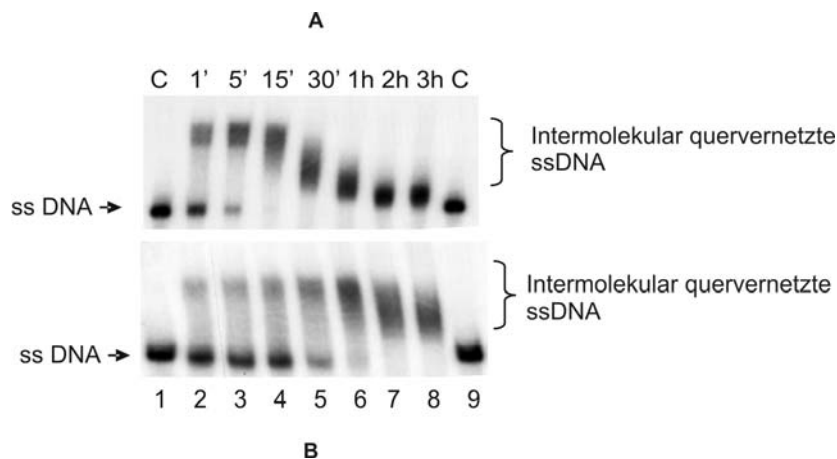


Abb. 31: **Analyse der intermolekularen Quervernetzungen der Hydroxylamin-Platin(II)-Komplexe.** Autoradiogramm der Reaktionsprodukte von 60 μ M KP1556 (*cis*) (A) bzw. KP1555 (*trans*) (B) mit radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment nach Inkubation für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Harnstoffgel. Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 3 h inkubiert.

Abb. 32 zeigt das Ergebnis dieser Analyse für Transplatin und Cisplatin. Beide Verbindungen konnten mit DNA intermolekulare QV ausbilden. Transplatin konnte diese Art von Addukt schneller als Cisplatin ausbilden; bereits nach 5 Minuten konnte in jedes DNA-Molekül mindestens eine intermolekulare QV eingefügt werden.

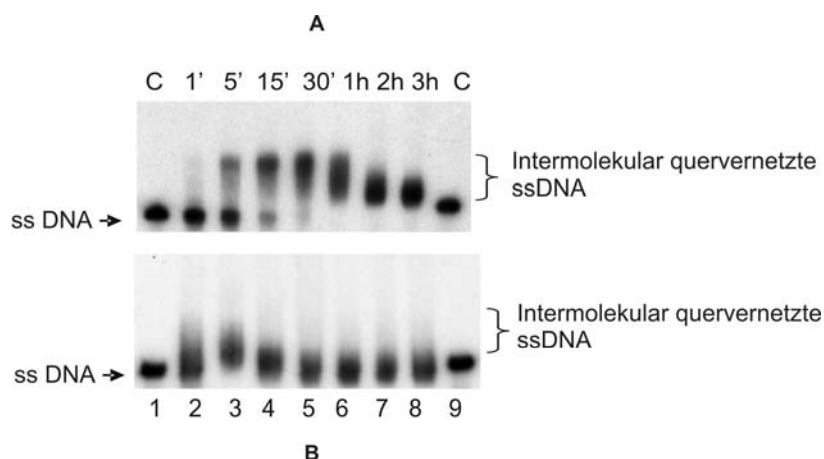


Abb. 32: **Analyse der intermolekularen Quervernetzungen von Cisplatin und Transplatin.** Autoradiogramm der Reaktionsprodukte von 60 μ M Cisplatin (A) bzw. Transplatin (B) mit radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment nach Inkubation für die angegebenen Zeitpunkte und elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Harnstoffgel (Bahnen 2-8). Bahn 1 = Kontroll-DNA nicht inkubiert, Bahn 9 = Kontroll-DNA für 3 h inkubiert.

3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Untersuchung der Reaktivitäten der *cis/trans*-Komplexe gegenüber DNA, ermittelt über die Bestimmung der r_B -Werte und die Retardation eines DNA-Fragments im Gel, hat gezeigt, dass die Effizienz einer Verbindung DNA zu modifizieren nicht unbedingt mit ihrer zytotoxischen Eigenschaft korreliert. Obwohl KP1351 (*trans*) in den Vorarbeiten eine hohe Zytotoxizität aufwies, war die Reaktivität gegenüber DNA gering. Im Gegensatz dazu zeigte das entsprechende *cis*-Isomer KP1352 eine höhere Reaktivität gegenüber DNA um den Faktor 3-4, aber eine ca. 15-16-mal geringere Zytotoxizität in den untersuchten Zelllinien. Für die Komplexe KP1555 (*trans*) und KP1556 (*cis*) konnte eine um eine Größenordnung höhere Reaktivität gegenüber DNA als bei den Acetoximkomplexen detektiert werden. Obwohl die Effizienz beider Hydroxalminderivate, DNA zu platinieren, vergleichbar war, ist das *trans*-Derivat KP1555 praktisch zytotoxisch inaktiv im Gegensatz zum potenten KP1556 (*cis*). Die Beobachtung, dass wenig reaktive Verbindungen eine hohe Zytotoxizität aufweisen oder umgekehrt, dass nicht zytotoxische Verbindungen eine hohe Reaktivität gegenüber DNA zeigen ist bemerkenswert, aber bekannt: Für das inaktive Transplatin wurde in dieser und anderen Arbeiten gezeigt, dass es gegenüber DNA eine höhere Reaktivität aufweist als Cisplatin (s. z.B. [114]). Auf der anderen Seite konnte für die, zum Komplex KP1351 (*trans*) strukturverwandte Verbindung *trans*-dichlorobis(*E*-iminoether)platinum(II) (*trans*-EE), eine geringe Reaktivität gegenüber DNA beobachtet werden, aber eine vergleichbare Zytotoxizität zu Cisplatin in der Leukämie Zelllinie P388 [120,123].

Diese Ergebnisse bestätigen, dass es für die Zytotoxizität eine größere Rolle spielt als die Reaktivität der Verbindung, welche Art von Addukten auf der DNA entstehen und wie die entstandenen DNA-Addukte weiter prozessiert werden (Zytotoxizität versus Reparatur).

Für alle vier untersuchten Verbindungen und die Kontrollsubstanzen Cis- und Transplatin konnte anhand der Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur ein Aufdrillen der DNA abgeleitet werden, was für die Ausbildung von monofunktionalen Addukten mit der DNA spricht. Für die *cis*-Isomere kann das detektierte Biegen der DNA durch bifunktionale Addukte verursacht worden sein. Für einige aktive *trans*-Platinderivate konnte ein Biegen der DNA auch durch die Ausbildung von

monofunktionalen Addukten nachgewiesen werden [124-126]. Allerdings wird für *trans*-Komplexe, die heterozyklische Liganden enthalten, zusätzlich eine Wechselwirkung der π -Orbitale dieser Liganden mit DNA angenommen, was die Ausbildung von „pseudobifunktionalen“ Addukten zur Folge hätte [126].

Die experimentelle Unterscheidung von bifunktionalen Addukten in intra- und intermolekulare Quervernetzungen ergab, dass die Hydroxylamin-Platin(II)-Komplexe KP1555 (*trans*) und KP1556 (*cis*) gegenüberliegende DNA-Stränge miteinander verknüpfen konnten, wobei die Effizienz der Ausbildung mit der von Cisplatin bzw. Transplatin vergleichbar war. Somit kann zumindest für das zytotoxisch aktive *cis*-Isomer KP1556 die Beteiligung der intermolekularen QV bei der Vermittlung der Zytotoxizität nicht ausgeschlossen werden. Auf der anderen Seite sind intermolekulare QV nicht generell ausreichend, um den Zelltod hervorzurufen, da KP1555 (*trans*) trotz Ausbildung dieser Art von Addukt eine geringe Zytotoxizität aufwies. Die stark zytotoxisch wirksame *trans*-Acetoximverbindung KP1351 und sein inaktives *cis*-Isomer KP1352 konnten beide keine intermolekularen QV mit DNA ausbilden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass intermolekulare QV bei der Vermittlung der Zytotoxizität im Fall von KP1351 (*trans*) keine Rolle spielen können. Auch für das verwandte *trans*-EE wurde nur eine sehr geringe Effizienz der Ausbildung von intermolekularen QV gefunden [120,123]. Die Ergebnisse der Quervernetzungseigenschaften der Acetoximkomplexe zeigen, dass das Biegen der DNA nicht von der Verknüpfung gegenüberliegender Basen, sondern durch intramolekulare Verknüpfungen, oder wie oben erklärt, im Falle von KP1351 (*trans*) auch durch monofunktionale Addukte verursacht werden könnte. Im Gegensatz dazu kann das durch die Verbindungen KP1555 (*trans*) und KP1556 (*cis*) verursachte Biegen der DNA durch alle Arten von Addukten hervorgerufen worden sein.

Eine Beobachtung, die für alle untersuchten *trans*-Verbindungen gemacht werden konnte, war eine geringere Beschleunigung der offen zirkulären Plasmidform im Agarosegel aufgrund einer geringeren Biegung der DNA im Vergleich zum entsprechenden *cis*-Isomer bei vergleichbarer DNA-Aufdrillung. Diese Erscheinung könnte ein Hinweis darauf sein, wenn das Biegen der DNA durch bifunktionale Addukte verursacht wurde, dass die Reaktion der zweiten Platinvalenz aller *trans*-Verbindungen mit der DNA teilweise behindert war. Dadurch blieb ein Großteil ihrer Addukte mit der DNA praktisch monofunktional. Interessanterweise konnte diese Beobachtung auch mit Plasmid-DNA gemacht werden, die mit *trans*-EE modifiziert

war. Allerdings wurde dieses Phänomen nicht als solches erkannt und nicht mit einer weniger reaktiven zweiten Platinvalenz in Verbindung gebracht. [123]. Die bevorzugte Ausbildung von monofunktionalen DNA-Addukten von Transplatin ist bekannt. Der Grund dafür liegt in seiner Hydrolyse, deren zwei Stufen andere Geschwindigkeitskonstanten als die von Cisplatin aufweisen: Der Abgang der ersten Fluchtgruppe Chlorid von Transplatin ist im Vergleich zu Cisplatin schneller, der Abgang der zweiten langsamer. Die geringere Geschwindigkeit des zweiten Hydrolyseschritts wird auf den geringeren *trans*-Labilisierungseffekt von Wasser zurückgeführt, das *trans*-ständig zur zweiten Fluchtgruppe Chlorid steht. Im Gegensatz dazu befindet sich bei Cisplatin *trans*-ständig zur Fluchtgruppe eine Aminogruppe, welche einen größeren *trans*-Labilisierungseffekt hat [127]. Diese Unterschiede in der *trans*-Labilisierung im zweiten Hydrolyseschritt könnten auch im Falle der Hydroxylamin- und Acetoximkomplexe der Grund für die behinderte Reaktion der zweiten Platinvalenz sein.

In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass die Beobachtung einer verminderten Mobilisierung der oc-Plasmidform als ein Hinweis für die präferentielle Ausbildung von monofunktionalen Addukten von *trans*-Platinverbindungen im allgemeinen herangezogen werden könnte, wie hier zum ersten Mal geschehen.

Da die Untersuchungen der DNA-Sekundärstrukturveränderungen zeigten, dass KP1351 (*trans*) v. a. monofunktionale Addukte mit DNA bilden kann, könnten diese auch einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung der ausgeprägten Zytotoxizität dieser Verbindung leisten. Sie könnten z.B. besonders potente Addukte darstellen, die nicht repariert werden können. In diesem Zusammenhang wurde für *trans*-EE gefunden, welches auch bevorzugt monofunktionale Addukte ausbildet, dass die zweite freie Platinvalenz bestimmte Proteine (z.B. Histon H1) in vitro mit der DNA quervernetzen konnte [125]. Solche Protein-DNA-Komplexe können z.B. die DNA-Replikation behindern, aber vor allem das NER-Reparatursystem bei der Entfernung von Addukten stören. Damit wäre eine Grundvoraussetzung für die Zytotoxizität einer Verbindung erfüllt, nämlich die Persistenz ihrer Addukte auf der DNA. Da KP1351 (*trans*) nicht nur strukturell mit *trans*-EE verwandt ist, sondern auch ähnliche Eigenschaften gegenüber DNA zeigte, könnte auch hier die Ausbildung von Protein-DNA-Komplexen zu den zytotoxischen Eigenschaften von KP1351 (*trans*) zählen. Weitere Untersuchungen im Anschluss an diese Arbeit sollen dies aufzeigen.

Anhand der vorliegenden Daten ließ sich feststellen, dass KP1555 (*trans*) und KP1556 (*cis*) in Bezug auf die Zytotoxizität, der klassischen Struktur-Aktivitäts-Beziehung entsprachen, aber im Gegensatz zu den parentalen Verbindungen schneller mit DNA reagierten, zytotoxisch weniger aktiv waren, und dass das *cis*-Derivat reaktiver als das *trans*-Derivat war. Dies bedeutet, dass die Einführung einer Hydroxylgruppe tatsächlich zu einer beschleunigten Reaktion mit DNA führte, diese aber keinen Einfluss auf die Zytotoxizität der Verbindungen hatte. Die durch die Zytotoxizitätstest für KP1351 (*trans*) und KP1352 (*cis*) ermittelte Umkehr der klassischen Struktur-Aktivitätsbeziehung (*trans* zytotoxisch aktiver als *cis*) spiegelte sich auch in den Reaktivitäten und in der Ausbildung der Addukte wider, wenn diese mit Cis- und Transplatin verglichen werden: Das *cis*-Derivat konnte schneller mit DNA reagieren und Strukturveränderungen schneller induzieren, war dafür aber zytotoxisch inaktiv. Das *trans*-Derivat zeigte in den untersuchten Zelllinien eine ausgeprägte Zytotoxizität, eine geringere Reaktivität gegenüber DNA und weniger ausgeprägte Strukturveränderungen der DNA.

III: Umsetzung des „prodrug“ Prinzips: Platin(II)-Ringschluss-Komplexe



Abb. 33: Formeln der untersuchten Platin(II)-Ringschluss-Komplexe.

Der Begriff „*prodrug*“ im Allgemeinen bezeichnet einen Wirkstoff, der erst am gewünschten Ort des Körpers seine volle Aktivität entfaltet. Dieses „*prodrug*“ Prinzip sollte auch für Platinverbindungen ausgenutzt werden, um deren direkte Aktivierung in Tumorzellen zu erreichen. Dies würde eine gezielte Therapie, und durch Verringerung der Aktivität der Verbindungen im normalen Gewebe auch weniger Nebenwirkungen bedeuten. Einen möglichen Ansatz für dieses Konzept stellt der niedrige pH-Wert von Tumorgewebe dar. Durch eine ungenügende Versorgung des Tumors mit Blut, kommt es häufig zu einer Unterversorgung dieses Gewebes mit Sauerstoff (= Hypoxie) [128,129]. Der Sauerstoffmangel bedingt eine anaerobe Glykolyse, bei der große Mengen an Laktat freigesetzt werden. Mit zunehmender Tumorgroße verstärkt sich dieser Effekt, und es kommt als weitere Konsequenz zu einer Erniedrigung des intra- und extrazellulären pH-Wertes (= Azidose).

Im Falle der Platin(II)-Ringschlussverbindungen wird ein Aktivierungseffekt in der Tumorzelle durch eine besondere chemische Struktur angenommen: Die Verbindungen KP1356 und KP1433 (Abb. 33) enthalten Bis-Aminoethanol bzw. Bis-Aminobutanol als bleibende Liganden [130,131]. Durch diese Liganden war es möglich, pH-abhängige Verbindungen zu schaffen. Bei neutralen bzw. alkalischen pH-Werten wird durch Angriff des Sauerstoffatoms der Alkoholgruppe an das zentrale Platinatom ein Alkoholatoaminchelating gebildet, wobei gleichzeitig ein Chloroligand abgeht. Diese intramolekulare Ligandenaustauschreaktion führt zur Blockierung der reaktiven Valenzen des Platins. Bei niedrigeren pH-Werten kommt es durch angreifende Protonen am Sauerstoffatom des Chelattrings wieder zur Darstellung der einfach bzw. zweifach ringoffenen Verbindung [85,132]. Somit ist die

Reaktion der nicht mehr blockierten Platinvalenzen mit nukleophilen Komponenten der Zelle wieder möglich. Abb. 34 soll diese Reaktionen schematisch verdeutlichen.

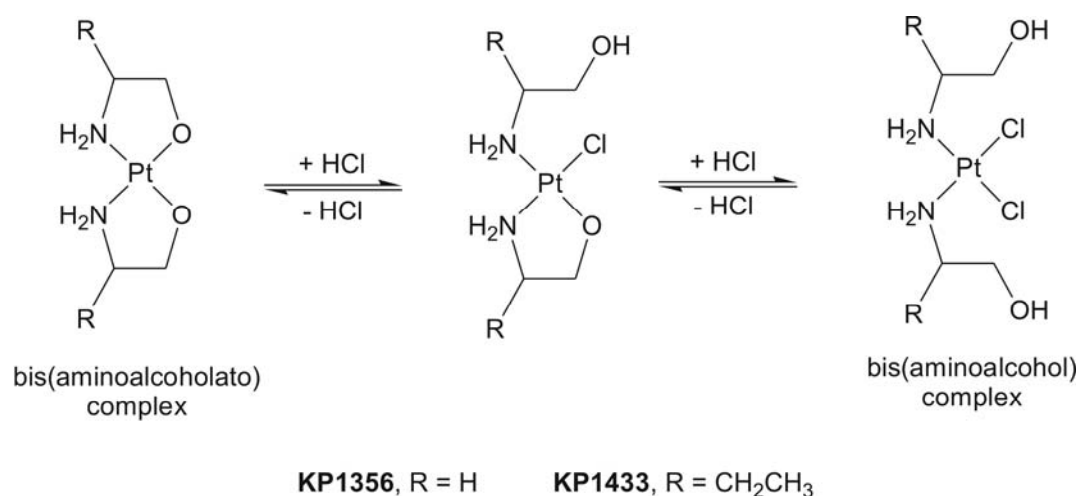


Abb. 34: pH-abhängiges Gleichgewicht der Platin(II)-Ringschluss-Komplexe.

Tatsächlich zeigte sich in Vorversuchen, dass eine Erhöhung der Zytotoxizität beider Komplexe in der Zelllinie A549 (Zellen des humanen nicht-kleinzelligen Lungenkrebs) nach Ansäuerung des verwendeten Zellkultur Mediums um den Faktor 2-3 erreicht werden konnte [133]. Diese Erhöhung der Zytotoxizität kann aber durch mehrere Faktoren verursacht worden sein, wie z.B. erhöhte Aufnahme der Verbindungen in die Zelle, verringerter Efflux der Verbindungen aus den Zellen, oder eben auch durch eine vermehrte Adduktbildung der Verbindungen mit DNA.

In dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob die höhere Zytotoxizität der vorgestellten Verbindungen bei niedrigeren pH-Werten auf eine erhöhte Reaktivität gegenüber der DNA zurückzuführen ist. Dabei sollten jedoch nicht nur die auftretenden Reaktivitätsunterschiede, sondern auch die induzierten Strukturveränderungen der DNA bei pH 7,4 und pH 6,0 bestimmt werden, die Aufschluss über die ausgebildeten Addukte geben können. Als Kontrolle wurde in diesem Zusammenhang auch die pH-Abhängigkeit der Adduktbildung der parentalen Verbindung Cisplatin in vitro analysiert.

Ergebnisse

1. DNA-Sekundärstrukturveränderungen und Reaktivität gegenüber DNA

Abb. 35 A und B zeigt das Ergebnis der Inkubation von Plasmid, einem radioaktiv markierten DNA-Fragment und KP1356 für 1 h bis 7 h in Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4 und anschließender Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem Agarose- bzw. Polyacrylamidgel.

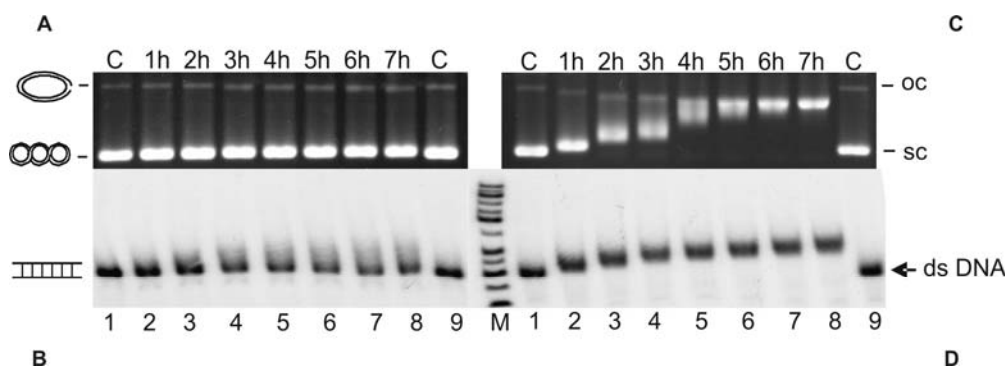


Abb. 35: Analyse der Inkubation von 60 μ M Verbindung KP1356 mit Plasmid pTZ18u (**A**, **C**) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (**B**, **D**) bei pH 7,4 (**A**, **B**) und pH 6,0 (**C**, **D**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**, **C**), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (**B**, **D**). Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 7 h inkubiert. M = 50 bp DNA-Leiter.

Es ist deutlich, dass auch nach 7 h Inkubation keine nennenswerten Änderungen der Plasmidmigration, höchstens eine schwache Retardation der superzirkulären Plasmidform, im Gel zu sehen ist, was für eine Aufdrillung der DNA spricht. Die Aufdrillung der DNA ist von einer sehr kleinen Veränderung des Laufverhaltens des Fragments im Polyacrylamidgel begleitet (Abb. 35 B). D.h. die Verbindung zeigte unter diesen Bedingungen eine äußerst geringe Reaktivität gegenüber der DNA und dementsprechend auch geringe DNA-Strukturveränderungen. Die Reaktivität der Verbindung und auch die sichtbare Veränderung des Laufverhaltens des Plasmids lässt sich drastisch durch Inkubation der Reaktionspartner in Gegenwart eines Phosphatpuffers mit pH 6,0 erhöhen. Wie in Abb. 35 C zu sehen ist, ist nun eine deutliche Verlangsamung der superzirkulären Plasmidform (Aufdrillung der DNA) und eine Beschleunigung der offenzirkulären Plasmidform (Biegung der DNA) zu sehen.

Die Strukturveränderungen der DNA sind dabei von einer deutlichen Verlangsamung des DNA-Fragments im Polyacrylamidgel begleitet. Dies bedeutet, dass die beschleunigte Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturveränderungen bei pH 6,0 auf eine erhöhte Reaktivität der Verbindung gegenüber DNA zurückzuführen war, die im Vergleich zu pH 7,4 mit einem Faktor von mindestens 10 angegeben werden kann.

Die Ringschlussverbindung KP1433 konnte bei pH 7,4 für den untersuchten Zeitraum von 1 h bis 7 h die DNA-Sekundärstruktur überhaupt nicht beeinflussen, begleitet von einer nicht detektierbaren Veränderung des DNA-Fragments im Polyacrylamidgel (Bilder nicht gezeigt). Allerdings konnte auch mit diesem Komplex wie in Abb. 36 gezeigt, durch die Inkubation von DNA und KP1433 in Gegenwart eines Phosphatpuffers mit pH 6,0 eine Reaktion induziert werden. Beschleunigung der offen zirkulären und Verlangsamung der superzirkulären Plasmidform sind nun deutlich erkennbar. D.h. auch für KP1433 kann ein Aufdrillen und Biegen der DNA bei pH 6,0 angenommen werden. Dies ist bei pH 6,0 von einer langsameren Migration des DNA-Fragments im Polyacrylamidgel begleitet (Abb. 36 B).

Ein Vergleich der beiden Ringschlussverbindungen ergab, dass KP1356 bei pH 6,0 im Vergleich zu Verbindung KP1433 eine ca. doppelt so hohe Effizienz aufwies, Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur zu induzieren, begleitet von einer ebenso ca. doppelt so hohen Reaktivität gegenüber DNA.

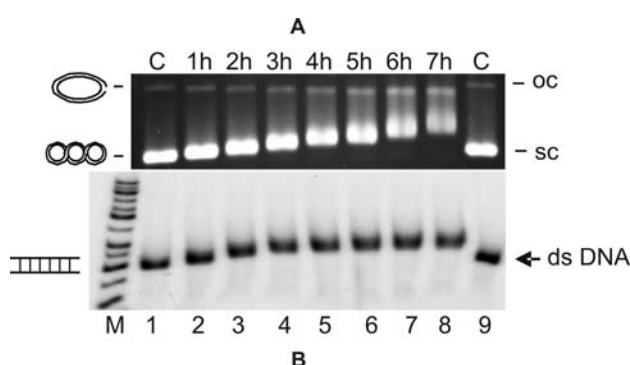


Abb. 36: Analyse der Inkubation von 60 µM Verbindung KP1433 mit Plasmid pTZ18u (A) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (B) bei pH 6,0 für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (A), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (B). Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9, Kontroll-DNA 7h inkubiert. M = 50 bp DNA-Leiter.

Auch für Cisplatin konnte, wie in Abb. 37 zu sehen, eine pH-Abhängigkeit der DNA-Strukturveränderungen beobachtet werden, wobei Cisplatin im Gegensatz zu beiden Ringschlussverbindungen nach 1 h Inkubation in Phosphatpuffer pH 7,4 bereits einen deutlichen Einfluss auf das Laufverhalten der Plasmid-DNA zeigte (Abb. 37 A). Der Koaleszenzpunkt, an dem die superzirkuläre und offen zirkuläre Plasmidform deckungsgleich laufen, wurde nach 3 h, vergleichbare Strukturveränderungen wurden bei pH 6,0 nach ca. 2 Stunden Inkubation erreicht (Abb. 37 C). Die Art der induzierten DNA-Strukturveränderungen bei beiden pH-Werten unterscheidet sich nicht, da anhand der Analyse der Plasmidmigration ein Aufdrillen, als auch ein Biegen der DNA gezeigt werden konnte. Allerdings beträgt der Unterschied zwischen pH 7,4 und pH 6,0 nur Faktor 2, und ist somit wesentlich geringer ausgeprägt im Vergleich zu den Verbindungen KP1356 und KP1433.

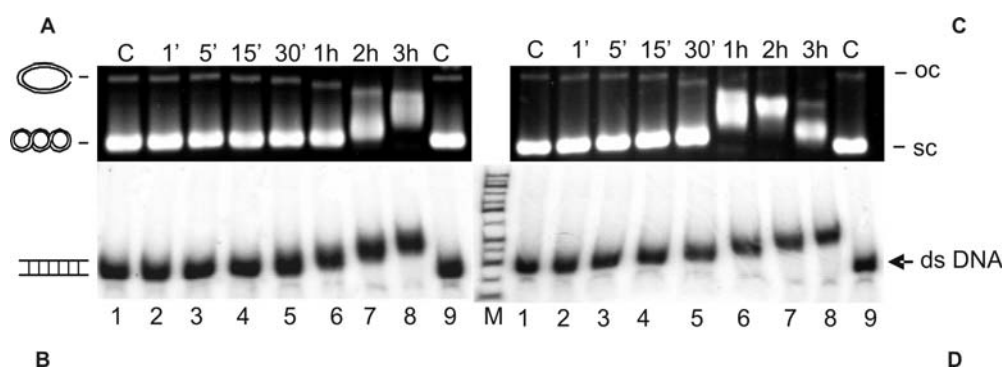


Abb. 37: Analyse der Inkubation von 60 µM Cisplatin mit Plasmid pTZ18u (A, C) und radioaktiv endmarkierten 177 bp ds DNA-Fragment (B, D) bei pH 7,4 (A, B) und pH 6,0 (C, D) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (A, C), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (B, D). Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 3 h inkubiert. M = 50 bp DNA-Leiter.

Ein Vergleich der Effizienz der untersuchten Komplexe Veränderungen der DNA-Sekundärstruktur bei pH 6,0 hervorgerufen, ergab eine um den Faktor 2 höhere Reaktivität von Cisplatin gegenüber KP1356 und eine 3-4 fache höhere Reaktivität gegenüber KP1433.

Bei genauem Vergleich des Laufverhaltens der Reaktionsprodukte im Agarosegel aller drei Komplexe bei pH 6,0 wurde nicht nur der Reaktivitätsunterschied, sondern auch eine andere Beeinflussung der offen zirkulären Plasmidform durch die Ringschlussverbindungen im Vergleich zu Cisplatin deutlich. Sowohl durch KP1356

als auch durch KP1433 erfährt die offen zirkuläre Plasmidform eine geringere Beschleunigung im Gel bei vergleichbarem Aufdrillungsgrad der DNA.

Eine quantitativere Aussage über die Reaktivitäten der untersuchten Verbindungen gegenüber DNA lieferte die Berechnung der r_B -Werte. Für die Ermittlung dieses Wertes wurde die Platinierung des eingesetzten Plasmids nach Inkubation in Phosphatpuffer pH 7,4 bzw. 6,0 in Gegenwart der entsprechenden Verbindung für die angegebenen Zeitpunkte über ICP-MS bestimmt. Da für KP1433 und KP1356 bei pH 7,4 die r_B -Werte wegen der zu geringen Platinierung der DNA nicht ausgewertet werden konnten, wurden nur die r_B -Werte für die Untersuchungen bei pH 6,0 berechnet und verglichen. Wie in Abb. 38 in einer repräsentativen Experimentenserie zu sehen ist, zeigte Cisplatin eine ca. zweifach höhere Reaktivität als KP1356 und eine ca. 3-4-mal höhere Reaktivität als KP1433 bei pH 6,0. Diese Reaktivitätsunterschiede spiegeln die festgestellten Unterschiede bei den entsprechenden Analysen der Retardation des DNA-Fragments bei pH 6,0 sehr gut wider.

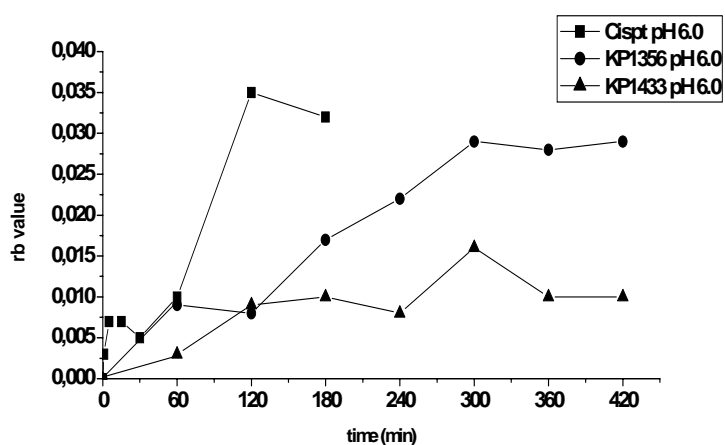


Abb. 38: Grafische Darstellung der r_B Werte bei pH 6,0 für Cisplatin (■), KP1356 (●) und KP1433 (▲) für die angegebenen Zeitpunkte.

2. Analyse der intermolekularen Quervernetzungen (QV)

Das Ergebnis der Inkubation von KP1356 und einem radioaktiv markierten DNA-Fragment bei pH 7,4 und anschließender Analyse der Reaktionsprodukte in einem denaturierenden Harnstoffgel ist in Abb. 39 A zu sehen. Das Autoradiogramm zeigt, dass nach 7 h Inkubationszeit ca. 50% der vorher einzelsträngigen DNA mindestens eine intermolekulare QV mit KP1356 aufwies. Diese Spezies ist als langsamer

laufende Bande im Gel sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigte die gelektrophoretische Auftrennung der Reaktionsteilnehmer nach Inkubation in Puffer mit einem pH-Wert von 6,0, dass bereits nach zweistündiger Inkubation keine freie DNA mehr sichtbar war (Abb. 39 B). Dies bedeutet, dass alle einzelsträngigen DNA-Moleküle mindestens eine intermolekulare QV beinhalten und dadurch die DNA-Stränge auch unter denaturierenden Bedingungen nicht mehr getrennt werden konnten.

KP1433 hat, wie in Abb. 39 C zu sehen ist, bei pH 7,4 nur eine geringe Kapazität, gegenüberliegende DNA-Stränge zu vernetzen, sichtbar an der nur schwach detektierbaren langsamer laufenden Spezies nach 4 h Inkubation. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von DNA-Fragment und KP1433 in saurem Milieu dazu, dass nach 4 h, KP1433 in nahezu jedes DNA Molekül eine intermolekulare QV einfügen konnte. Nach 7 h Inkubation war praktisch keine freie einzelsträngige DNA mehr sichtbar (Abb. 39 D).

Beide Ringschlussverbindungen sind in der Lage, bei pH 6,0 DNA Moleküle mehr als 7 mal schneller zu vernetzen im Vergleich zu pH 7,4, wobei bei beiden pH-Werten KP1356 im Vergleich zu KP1433 eine 2-3 mal höhere Effizienz zeigte diese Art von Addukt mit der DNA auszubilden.

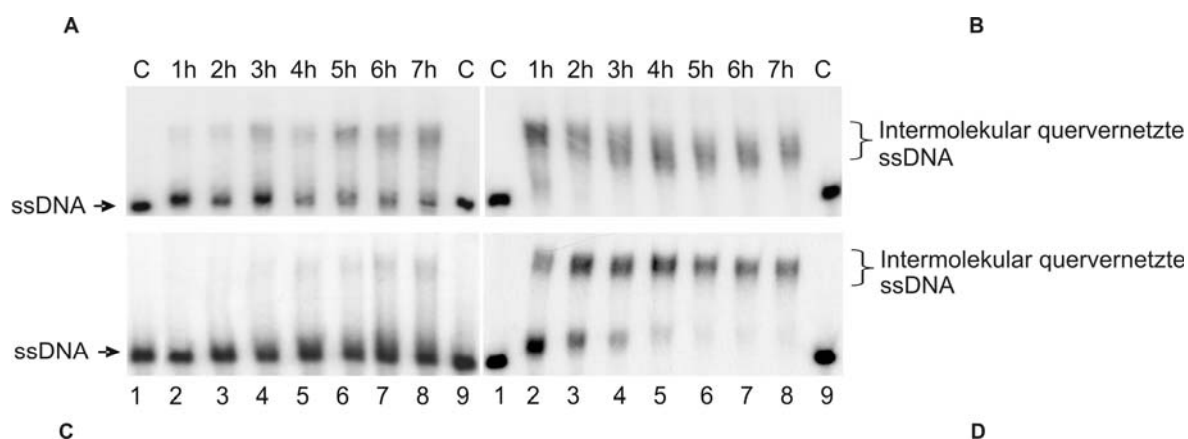


Abb. 39: Analyse der intermolekularen QV der Platin(II)-Ringschlussverbindung bei pH 7,4 und pH 6,0: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte von 60 μ M KP1356 bei pH 7,4/pH 6,0 (**A/B**) und KP1433 bei 7,4/pH 6,0 (**C/D**) mit radioaktiv markierten 177 bp ds DNA-Fragment nach Inkubation für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Harnstoffgel. Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 7 h inkubiert.

Die Analyse der intermolekularen Quervernetzungen von Cisplatin bei pH 7,4 und pH 6,0 ergab, dass bei einem pH-Wert von 7,4 nach 2 h Inkubation diese Art von Addukt

mit der DNA ausgebildet werden konnte (Abb. 40 A). Überraschenderweise konnte die Fähigkeit von Cisplatin DNA-Stränge zu verknüpfen, durch Verwendung eines Inkubationspuffers mit pH 6,0 deutlich gesteigert werden. Bereits nach 30 Minuten unter diesen Bedingungen war keine einzelsträngige DNA mehr sichtbar (Abb. 40 B). Der Unterschied zwischen pH 7,4 und pH 6,0 kann mit einem Faktor von > 10 angegeben werden. Im Vergleich zu den Verbindungen KP1356 und KP1433 war Cisplatin bei beiden pH-Werten den Ringschlussverbindungen in der Ausbildung von intermolekularen QV überlegen.

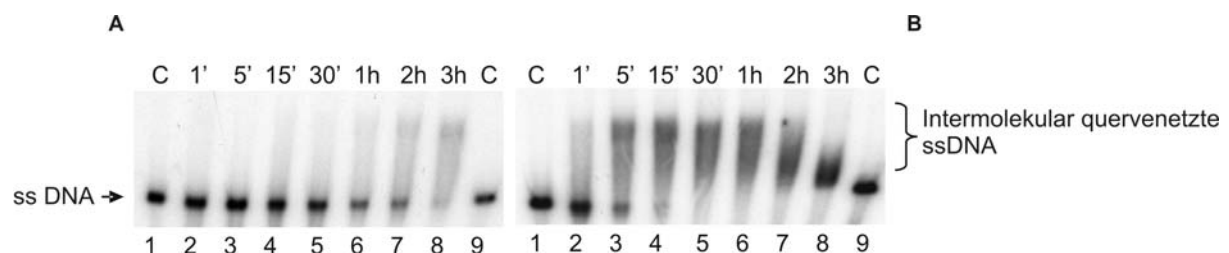


Abb. 40: Analyse der intermolekularen QV von Cisplatin bei pH 7,4 und pH 6,0: Autoradiogramm der Reaktionsprodukte von 60 μ M Cisplatin bei pH 7,4/pH 6,0 (**A/B**) mit radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment nach Inkubation für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und elektrophoretischer Auftrennung in einem denaturierenden 4% Polyacrylamid-Harnstoffgel. Bahn 1 (C), Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 3 h inkubiert.

3. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die untersuchten Ringschlussverbindungen konnten bei pH 7,4 die DNA-Sekundärstruktur gar nicht (KP1433), oder nur wenig (KP1356) beeinflussen. Im Gegensatz dazu führten beide Komplexe bei pH 6,0 zu einem deutlichen Aufdrillen und Biegen der DNA, wobei KP1356 eine doppelt so hohe Effizienz zeigte diese Art von Strukturveränderungen einzuführen. Die schnellere Ausbildung war dabei auf einen höheren Platinierungsgrad der DNA zurückzuführen, wie durch die Fragmentanalyse und Bestimmung der r_B -Werte gezeigt. Anhand der ermittelten Strukturveränderungen kann davon ausgegangen werden, dass KP1433 und KP1356 sowohl mono- als auch bifunktionale Addukte bei pH 6,0 mit der DNA ausbilden können. Allerdings konnte im Vergleich zu Cisplatin ein geringeres Biegen der DNA (geringere Beschleunigung der oc Plasmidform im Agarosegel) festgestellt werden. Da die Beeinflussung der offen zirkulären Plasmidform durch bifunktionale Addukte hervorgerufen wird (Ausnahmen siehe *cis/trans*-Komplexe), lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass die Fähigkeit von KP1356 und KP1433 bifunktionale Addukte mit der DNA auszubilden beeinträchtigt war. Die Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen der Verbindungen als mögliche bifunktionale Addukte wurde bei beiden pH-Werten direkt nachgewiesen.

Die niedrige Reaktivität gegenüber DNA bei pH 7,4 für beide Verbindungen wurde von anderen Autoren mit dem Modellnukleotid 5'-GMP gezeigt [133-136]. Mit dieser Analyse konnte eine deutliche Zunahme der Reaktivität beider Komplexe gegenüber dem Nukleotid bei pH 6,0 beobachtet werden, wobei KP1356 analog zu den Untersuchungen dieser Arbeit, reaktiver als KP1433 war. Mit diesen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass das Hauptaddukt der Verbindungen ein Monoaddukt der jeweils einfach ringgeschlossenen Verbindung mit GMP darstellt. Zwar wurde auch das Bisaddukt gebildet, erreichte aber in dem untersuchten Zeitraum nie das Ausmaß des Monoaddukts. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der Vermutung, dass beide Verbindungen im Vergleich zu Cisplatin, weniger bifunktionale Addukte mit Plasmid-DNA ausbilden konnten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch unter den gewählten Bedingungen der DNA-Strukturveränderungen beide Komplexe vor allem in der einfach ringgeschlossenen Form (s. Abb. 34) vorliegen, und somit die zweite Platin Valenz für eine Reaktion mit DNA-Basen nicht zur Verfügung steht.

Wie die Vorarbeiten zeigten, waren die ermittelten IC_{50} -Werte für beide Komplexe in der Zelllinie A549 bei pH 6,0 nur um den Faktor 2,4-3,3 niedriger als bei pH 7,4 [133]. Im Gegensatz dazu, war die Effizienz der DNA-Adduktbildung bei pH 6,0 in der vorliegenden Untersuchung um ca. den Faktor 10 höher. Deshalb kann, obwohl weitere Effekte nicht ausgeschlossen werden können, anhand dieser Ergebnisse die beschleunigte Ausbildung von Addukten mit der DNA bei pH 6,0 als alleiniger Grund für die erhöhte Zytotoxizität unter sauren pH-Bedingungen betrachtet werden. Es sieht sogar so aus, dass die Komplexe durch einen oder mehrere Faktoren daran gehindert wurden, ihr komplettes zytotoxisches Potential bei saurem pH zu entfalten. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass die DNA-Addukte der Ringschlussverbindungen, obwohl sie schneller ausgebildet werden, schneller repariert werden können. Dies würde aber der Arbeit von Autoren widersprechen, die eine eingeschränkte Reparatur von Platin-DNA-Addukten in hypoxischen Zellen mit daraus resultierendem intrazellulärem sauren pH detektieren konnten [137-139]. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass der pH-Wert im inneren der Zelle weniger sauer ist, als der pH-Wert des künstlich angesäuerten Mediums. pH-Wert Messungen in anderen Arbeiten ergaben z.B. einen extrazellulären pH-Wert von 6,0 und einen intrazellulären pH-Wert von 6,64 [140]. Allerdings wurde in anderen Studien gezeigt, dass eine künstliche Ansäuerung des Kulturmediums auch einen *niedrigeren* intrazellulären pH-Wert zur Folge haben kann [141]. Der letztendliche Grund für die festgestellte 10-fache Erhöhung der durch die Ringschlussverbindungen hervorgerufenen DNA-Adduktbildung, aber nur einer ca. 3-fachen Erhöhung der Zytotoxizität bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 7,4 kann erst in weiterführenden Arbeiten durch die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes, der in die Zellen aufgenommen Platinmengen und der in vivo DNA-Modifikation bei unterschiedlichen pH-Werten genauer festgestellt werden.

Die Verbindung KP1433 wurde ursprünglich mit der Absicht synthetisiert, einen Platinkomplex mit erhöhter Lipophilie durch die Einführung von 2 zusätzlichen Ethylgruppen zu schaffen [131]. Diese erhöhte Lipophilie könnte zu einer verbesserten Aufnahme durch die Zellmembran führen. Allerdings konnte diese Modifikation nicht die Zytotoxizität von KP1433 erhöhen, sondern führte sogar zu einem verringerten Zelltod bei beiden pH-Werten. Auch die Ergebnisse der DNA-Strukturveränderungen, der Reaktivität gegenüber DNA und die Analyse der mit KP1433 gebildeten intermolekularen QV zeigten, dass diese Verbindung im

Vergleich zu KP1356 um den Faktor 2 weniger reaktiv war. D.h., vorausgesetzt die Verbindung würde tatsächlich besser in die Zelle aufgenommen, könnte die geringere Zytotoxizität von KP1433 durch die Ausbildung von weniger potenten Addukten mit der DNA verursacht werden.

Für Cisplatin besteht nicht die Möglichkeit einer Maskierung des Platinatoms bei pH 7,4. Die Konsequenz der zugänglichen Platinvalenzen ist die hohe Reaktivität gegenüber DNA und anderen Nukleophilen bei physiologischen pH-Werten. Aber auch Cisplatin zeigte bei pH 6,0 eine Reaktivitätszunahme gegenüber DNA, wenn auch eine geringere im Vergleich zu den Ringschlussverbindungen. Der Grund für die schnellere Ausbildung von Addukten könnte in der Entstehung von bestimmten Hydrolyseprodukte liegen: Bei physiologischen pH-Werten entsteht v.a. der Cisplatin (Hydroxo) (Aqua) Komplex der mit dem (Hydroxo) (Hydroxo) Komplex im Gleichgewicht steht. Bei pH-Werten < pH 7,2 wird das Gleichgewicht auf die Seite des Aqua- bzw. Di-Aqua-Komplexes von Cisplatin verschoben, die jeweils positiv geladen sind. Aus diesem Grund, und wegen der guten Abgangsgruppe Wasser, können diese Komplexe besser mit nukleophilen DNA-Basen reagieren [142-144]. Der positive Einfluss eines sauren pH-Wertes auf die Zytotoxizität, die Akkumulation im Zytoplasma und der in vitro Reaktivität von Cisplatin ist bekannt [140,145-147]. Eine pH-abhängige Adduktbildung wurde aber bisher nur für die in vivo Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen und Protein-DNA-QV analysiert [140]. In dieser Untersuchung wurden die DNA-Quervernetzungseigenschaften von Cisplatin in EMT6 Maus-Tumorzellen bei pH-Werten des Kulturmediums von 6,0 und 7,2 verglichen. Die Gesamtzahl der Quervernetzungen (also DNA-Protein und DNA-DNA) wurde bei pH 6,0 zwar verdoppelt, aber die Ausbildung von intermolekularen DNA-DNA-QV wurde in vivo nicht beeinflusst. Diese Daten waren aber das Ergebnis der Reaktion von Cisplatin mit DNA *und* der Entfernung von Addukten durch Reparatursysteme, so dass nicht *direkt* ihre Ausbildung bestimmt wurde. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Ausbildung der intermolekularen QV direkt untersucht und zum ersten Mal die pH-abhängige Ausbildung dieser Adduktart bei Cisplatin in vitro gezeigt. Diese Beobachtung könnte zum besseren Verständnis der Prozessierung von Cisplatin-Addukten beitragen.

Da Cisplatin auch eine pH-Abhängigkeit der Ausbildung von DNA-Addukten wie die Ringschlussverbindungen zeigte (stärker bei pH 6,0), liegt der Vorteil in der Anwendung von KP1356 und KP1433 in ihrer geringeren Reaktivität bei

physiologischem pH. Eine hohe Reaktivität von Platinverbindungen gegenüber DNA und anderen Nukleophilen, wie bei Cisplatin der Fall, ist meist mit einem erhöhten Nebenwirkungspotential verbunden. Ein guter Vergleich kann hier mit Oxaliplatin gezogen werden, dessen geringeres Nebenwirkungsspektrum im Vergleich zu Cisplatin, mit einer geringeren Reaktivität gegenüber nukleophilen Biomolekülen in Verbindung gebracht wird.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass Verbindungen mit Bis-Aminoalkoholgruppen aufgrund ihrer pH-sensitiven Eigenschaft zu hoch selektiven, antitumoral wirksamen „*prodrugs*“ mit weniger Nebenwirkungen in gesunden Zellen entwickelt werden könnten.

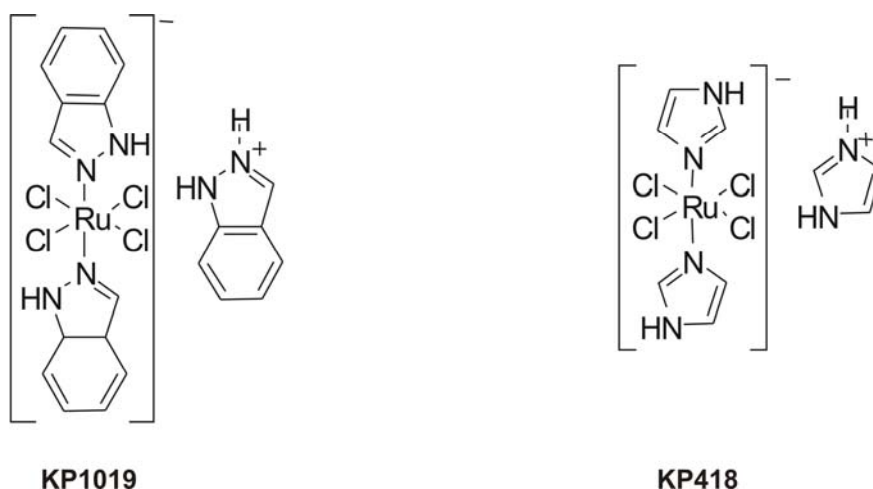
IV. Umsetzung des „prodrug“ Prinzips mit alternativen Metallverbindungen:**Ruthenium-Komplexe**

Abb. 41: Formeln der untersuchten Ruthenium Komplexe.

Das begrenzte Wirkungsspektrum, Nebenwirkungen und Resistenzen schränken die Anwendung von Platinverbindungen bei der Behandlung von Krebserkrankungen ein. Diese Nachteile führten nicht nur zu verschiedenen Bemühungen, Platinkomplexe zu optimieren, sondern auch zur Synthese und zur klinischen Evaluierung von alternativen Metallkomplexen, wie z.B. Gallium- oder Rutheniumverbindungen. Zu den bisher erfolgreichsten gehören, neben der Galliumverbindung KP46 (Tris(quinolinolato)gallium(III) [148], die Rutheniumverbindungen NAMI-A (H₂im)[trans-RuCl₄(Him)(dmsO)] [149] und KP1019 (Indazol-*trans*-[tetrachlorobis(1*H*-indazole) ruthenat(III)] [150], die beide zurzeit in der Klinik erprobt werden. KP1019, ein Gegenstand dieser Arbeit, wurde für die Behandlung von Endometrium-, Zungen-, Leber-, und kolorektalem Karzinom in der klinischen Phase I untersucht. Dabei zeigte sich für fünf von sechs Patienten eine Stabilisierung der Erkrankung für 8-10 Wochen, bei gleichzeitig niedrigem toxischen Potential der Verbindung [151,152].

KP1019 und sein Imidizolanaloges KP418 (Abb. 41), wurden bereits 1989 bzw. 1987 synthetisiert [153] und haben zahlreiche Untersuchungen zur Aufklärung ihres Wirkungsmechanismus durchlaufen. Trotzdem ist bis heute nicht vollständig geklärt, wie diese Metallkomplexe ihre zytotoxische Wirkung vermitteln können. Es wird angenommen, dass auch für Rutheniumverbindungen die DNA ein mögliches Zielmolekül darstellt [154]. Als Voraussetzung für die Reaktion von

Rutheniumverbindungen mit DNA oder anderen Nukleophilen der Zelle könnte die Reduktion von Ru^{III} zu Ru^{II} verantwortlich sein, auch „Aktivierung durch Reduktion“-Hypothese genannt [155,156]. Damit würden auch Rutheniumverbindungen, zu den sog. „*prodrugs*“ gehören, die erst in vivo ihre volle Wirksamkeit entfalten. Ruthenium in der Oxidationsstufe +II kann schneller mit Nukleophilen, also auch mit Basen der DNA, reagieren, da die Bindung zwischen Ru^{II} und den Fluchtgruppen (Chlorid) schwächer ist [157]. Das Redoxpotential von $\text{Ru}^{\text{III}}/\text{Ru}^{\text{II}}$ (0,00 bis 0,03 V) [158] lässt eine Reduktion durch z.B. Ascorbinsäure (-0,027 V) [159] oder auch durch GSH (-0,059 V) [158] vermuten. GSH (intrazelluläre Konzentration 0,5 mM bis 10 mM) [160] könnte aber selbst, bedingt durch seine nukleophilen Eigenschaften, mit dem Rutheniumatom koordinativ reagieren und dieses für die Reaktion mit anderen Nukleophilen (DNA-Basen) inaktivieren [161], wie es auch für Platinverbindungen diskutiert wird [162-164]. Es ist also a priori nicht voraussagbar, ob GSH zu einer Aktivierung oder Inhibierung der Reaktivität von Rutheniumkomplexen in der Zelle führen kann. Diese Uneindeutigkeit machte eine genauere Analyse der Reaktivität von KP1019 und KP418 unter verschiedenen Bedingungen notwendig.

Im folgenden Abschnitt sollten die durch die Komplexe KP418 und KP1019 hervorgerufenen DNA-Sekundärstrukturveränderungen und der Einfluss von Ascorbinsäure und GSH auf die Adduktbildung analysiert werden. Der Einfluss von GSH ist wegen seiner erhöhten Konzentration, v.a. in gegenüber Platinkomplexen resistenten Tumorzellen relevant. Ascorbinsäure wurde deshalb gewählt, weil sie nicht oder nicht zum gleichen Ausmaß wie GSH an Ruthenium koordiniert werden kann, und deshalb der alleinige Effekt der Ru^{III} -Reduktion überprüft werden konnte. Da bekannt ist, dass Rutheniumverbindungen in Anwesenheit von Licht und Sauerstoff durch direkten Elektronentransfer oder über die Bildung von Singulett-Sauerstoff und Hydroxylradikalen DNA-Strangbrüche induzieren können [165-168], wurden alle Versuche in An-/Abwesenheit von Licht und in An-/Abwesenheit von Sauerstoff durchgeführt.

Ergebnisse

1. Analyse der DNA-Sekundärstrukturveränderungen und der Einfluss von Reduktionsmitteln

Abb. 42 zeigt die Ergebnisse der Inkubation von Plasmid-DNA und einem linearen, radioaktiv markierten DNA-Fragment mit KP1019. Zum Vergleich wurde Plasmid-DNA im Dunkeln in Abwesenheit von Luftsauerstoff (Argonatmosphäre) inkubiert (Abb. 42 C). Beide Bilder zeigten, dass für den Rutheniumkomplex KP1019 weder der Einfluss von Licht, noch von Sauerstoff eine Rolle zu spielen scheint. Auch für alle weiteren Untersuchungen bezüglich beider Rutheniumverbindungen konnte kein Einfluss von Licht und Sauerstoff, weder in An- noch in Abwesenheit von Reduktionsmitteln, festgestellt werden. Deswegen wird auf den Einfluss von Licht bzw. Sauerstoff im Folgenden nicht mehr eingegangen.

Unter den gewählten Bedingungen kann eine hohe Reaktivität von KP1019 gegenüber DNA beobachtet werden. Bereits nach 5 Minuten Inkubation erfährt die superzirkuläre Plasmidform eine Verlangsamung im Agarosegel, d.h. die DNA kann aufgedrillt werden. Nach 30 Minuten liegt die vorher negativ superzirkuläre Form des Plasmids entspannt vor (gleiche Migrationseigenschaft wie offen zirkuläre Form) und wird bei weiterer Inkubation zu positiven Superzirkeln verdrillt, die im Gel wieder schneller laufen. Die hohe Effizienz in der Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturveränderungen ist von einer ausgeprägten Retardation des linearen DNA-Fragments im Polyacrylamidgel begleitet. Eine Beeinflussung der offen zirkulären Plasmidform durch KP1019 ist, wenn überhaupt, nur sehr schwach detektierbar. Offensichtlich wird diese kaum beeinflusst, was für eine geringe Biegung der DNA spricht (s. Pfeil Abb. 42 C).

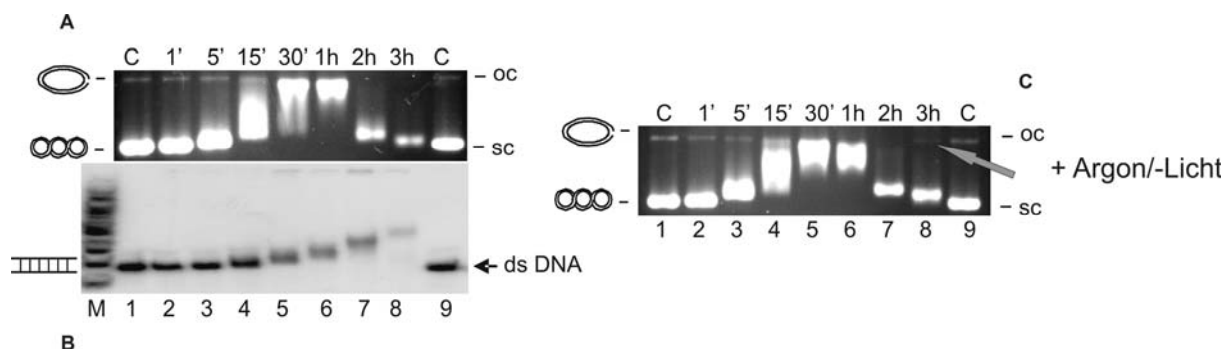


Abb. 42: Analyse der Inkubation von 60 μ M Verbindung KP1019 mit Plasmid pTZ18u (**C**: Inkubation im Dunkeln unter Argonatmosphäre) und radioaktiv endmarkierten 177 bp dsDNA-Fragment (**B**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**, **C**), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (**B**). Bahn 1 (C): Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C): Kontroll-DNA 3 h inkubiert, M = 50 bp DNA-Leiter.

In Abb. 43 sind die Ergebnisse der DNA-Strukturveränderungen dargestellt, die durch das Imidazolderivat KP418 hervorgerufen wurden. Nach 30 Minuten Inkubation wurde eine deutliche Verlangsamung der superzirkulären Plasmidform im Gel sichtbar. Allerdings geschieht dieses Aufdrillen der DNA um den Faktor 3 langsamer als mit KP1019, was in Übereinstimmung mit der langsameren Migration des linearen DNA-Fragments ist (Abb. 43 B). Auch KP418 kann die offen zirkuläre Plasmidform nur wenig beeinflussen, was durch deren geringe Beschleunigung im Agarosegel sichtbar wird.

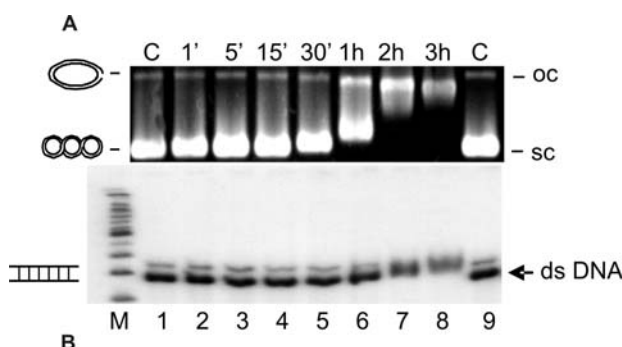


Abb. 43: Analyse der Inkubation von 60 μ M Verbindung KP418 mit Plasmid pTZ18u (**A**) und radioaktiv endmarkierten 177 bp ds DNA-Fragment (**B**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung: 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**), Autoradiogramm eines getrockneten 4% Polyacrylamidgels (**B**). Bahn 1 (C): Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C), Kontroll-DNA 3 h inkubiert, M = 50 bp DNA-Leiter.

Um die Frage zu beantworten, ob die DNA-Adduktbildung von Ascorbinsäure oder Glutathion beeinflusst wird, wurden beide Verbindungen in Anwesenheit eines jeden der beiden potentiellen Reduktionsmittel inkubiert. Die Ergebnisse für KP1019 in Abb. 44 zeigten, dass die Anwesenheit von Ascorbinsäure zu einem veränderten Verhalten des Komplexes gegenüber DNA führte. Das superzirkuläre Plasmid erfährt bereits nach 1 Minute durch die Aufdrillung der DNA eine Verlangsamung im Gel. Nach 5 Minuten Inkubation migrierte die relaxierte Form des Plasmids schneller im Vergleich zur Kontrolle, was für eine Biegung der DNA spricht. Dadurch wurde der Koaleszenzpunkt, an dem beide Formen deckungsgleich laufen, in Anwesenheit von Ascorbinsäure nach 15 Minuten Inkubation erreicht, d.h. etwas früher als die Inkubation ohne Ascorbinsäure. Nach längerer Inkubation wurden weitere Unterschiede sichtbar: Im Gegensatz zur Reaktion ohne Ascorbinsäure (Abb. 42) war nun eine deutlich schnellere Migration der offen zirkulären Form des Plasmids nach 5 Minuten sichtbar.

Die Inkubation von KP1019 mit Plasmid-DNA in Anwesenheit von GSH führte, wie in Abb. 44 B zu sehen, zu einer verminderten Ausbildung von Addukten mit DNA, besonders im Vergleich zur Inkubation in Anwesenheit von Ascorbinsäure. Das Aufdrillen der DNA und damit die Verlangsamung der superzirkulären Plasmidform im Gel trat verzögert ein, so dass der Koaleszenzpunkt erst nach 1 h bis 2 h Inkubation erreicht wurde. Trotz der geringeren Effizienz von KP1019, unter dem Einfluss von GSH die DNA aufzudrillen, kann zusätzlich ein Biegen der DNA nach ca. 1 h Inkubation durch die schnellere Migration der relaxierten Plasmidform detektiert werden.

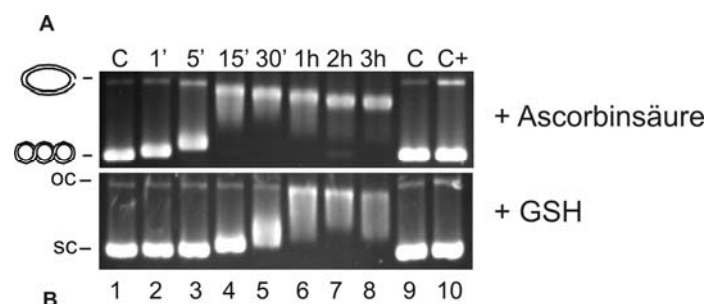


Abb. 44: Analyse der Inkubation von 60 μM Verbindung KP1019 mit Plasmid pTZ18u (**A**, **B**) in Anwesenheit von 120 μM Ascorbinsäure (**A**) oder 60 μM GSH (**B**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung in einem 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**, **B**). Bahn 1 (C): Kontroll DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C): Kontroll-DNA 3h inkubiert, Bahn 10 (C+): Kontroll-DNA in Anwesenheit von 120 μM Ascorbinsäure, oder 60 μM GSH 3 h inkubiert, M = 50 bp DNA-Leiter.

Die Inkubation von KP418 mit Plasmid-DNA in Anwesenheit von Ascorbinsäure führte zu keiner signifikanten Veränderung des Laufverhaltens des Plasmids (Abb. 45 A). In Abb. 45 B ist das Ergebnis der Inkubation von KP418 in Gegenwart von GSH zu sehen. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Adduktbildung von KP418 für den untersuchten Zeitraum (1'-3 h) fast vollständig inhibiert wurde. Das Laufverhalten des Plasmids veränderte sich praktisch nicht unter dem Einfluss von GSH.

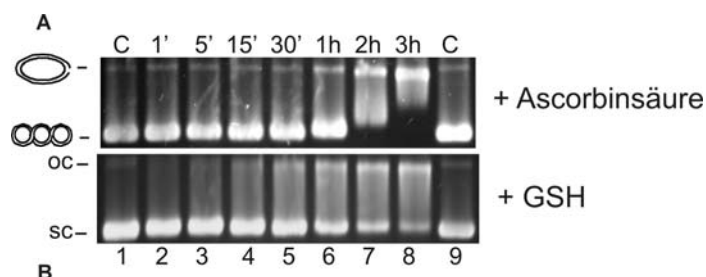


Abb. 45: Analyse der Inkubation von 60 μM Verbindung KP418 mit Plasmid pTZ18u (**A**, **B**) in Anwesenheit von 120 μM Ascorbinsäure (**A**) oder 60 μM GSH (**B**) für die angegebenen Zeitpunkte (Bahnen 2-8) und anschließender elektrophoretischer Auftrennung in einem 1% Agarosegel (Ethidiumbromid gefärbt) (**A**, **B**). Bahn 1 (C): Kontroll-DNA nicht inkubiert; Bahn 9 (C): Kontroll DNA 3 h inkubiert, M = 50 bp DNA-Leiter.

2. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Die Rutheniumverbindungen KP1019 und KP418 können die DNA-Sekundärstruktur beeinflussen. Beide Komplexe können die DNA aufdrillen, was für die Ausbildung von monofunktionalen Addukten spricht. KP418 zeigte bei der Ausbildung dieser Art von Addukt eine 3-mal geringere Effizienz, was auf eine ca. 3-mal geringere Reaktivität gegenüber DNA zurückzuführen war (Fragmentmigration). Für beide Komplexe konnte nur ein sehr schwach ausgeprägtes Biegen der DNA festgestellt werden (Mobilisierung der oc-Form). Diese Beobachtung ist ein Hinweis darauf, dass die Ausbildung von bifunktionalen Addukten von KP1019 und KP418 mit der DNA behindert zu sein scheint.

Für KP1019 konnte unter dem Einfluss der Reduktionsmittel Ascorbinsäure und Glutathion ein deutlich anderer Reaktionsmodus gegenüber DNA beobachtet werden. Die Aufdrillung der DNA in Anwesenheit von Ascorbinsäure war schneller, und es konnte zusätzlich eine deutliche Biegung der DNA identifiziert werden. Die beschleunigte Aufdrillung ist konsistent mit einer beschleunigten Ausbildung von monofunktionalen Addukten, also mit einer Erhöhung der generellen Reaktivität zumindest einer Ruthenium-Valenz. Die erleichterte Reaktion kann ein Hinweis auf die Reduktion von KP1019 sein, da, wie in der Einleitung angesprochen, für Ru^{II} die Bindung zu den Fluchtgruppen (Chlor) weniger stark als bei Ru^{III} ist. Die deutlich sichtbare Biegung der DNA zeigte, dass wahrscheinlich die Ausbildung von bifunktionalen Addukten ermöglicht wurde. Dies könnte bedeuten, dass unter den reduzierenden Bedingungen aus dem gleichen Grund, nämlich der Labilisierung der Fluchtgruppenbindungen, nun eine weitere Rutheniumvalenz leichter in der Lage war, mit DNA eine Reaktion einzugehen.

Anhand der vorliegenden Daten ist also eine Reduktion und damit Erhöhung der Reaktivität von KP1019 im Prinzip möglich. Obwohl Ascorbinsäure KP1019 im Blutplasma zwar reduzieren könnte, ist dies vermutlich vernachlässigbar, da der Großteil von KP1019 an Plasmaproteine, v. a. Albumin, gebunden vorliegt [151]. Untersuchungen zeigten, dass nur ein kleiner Teil des an Protein gebundenen Rutheniums durch Ascorbinsäure reduziert werden kann [169]. Damit würde der Gedanke des „*prodrug*“ Konzepts auch nicht verletzt werden.

Im Gegensatz zu KP1019 konnte für KP418 keine veränderte Reaktivität unter dem Einfluss von Ascorbinsäure festgestellt werden. Diese Beobachtung spricht dafür,

dass KP418 nicht von Ascorbinsäure reduziert werden kann. Dieses Ergebnis wäre dabei in Übereinstimmung mit dem niedrigeren Redoxpotential von KP418 im Vergleich zu KP1019 [158].

Die Reaktion von KP1019 mit DNA in Anwesenheit des Tripeptids GSH führte zu einer langsameren Aufdrillung aber zu einer sichtbaren Biegung der DNA. Die insgesamt langsamere Ausbildung von DNA-Addukten steht im Gegensatz zu den Daten die durch die Analyse der GMP-Anbindung von Keppler und Mitarbeitern erhalten wurden. Bei diesen Untersuchungen wurde bei einem zweifach molaren Überschuss an GSH keine signifikant veränderte Anbindung an GMP bei pH 7,4 gefunden [158]. Im Gegensatz dazu zeigten Frasca et al. [161], eine verminderte Reaktion von Rutheniumkomplexen gegenüber DNA unter dem Einfluss von GSH bei (GSH: Ru \geq 1), wobei im ersten Schritt die Reduktion des Rutheniums zu Ru^{II} beobachtet wurde, aber im zweiten die Koordination des Glutathions an das zentrale Rutheniumatom, was die verminderte Reaktivität erklären könnte. Die beschleunigte DNA-Biegung, die KP1019 unter dem Einfluss von GSH hervorrufen kann, ist möglicherweise ein Resultat von komplexen Vorgängen, die trotz der allgemein geringeren Reaktivität zu einer Favorisierung der Ausbildung von bifunktionalen Addukten führt.

Diese Beobachtungen führen zu folgender Hypothese, die in Einklang mit der „*prodrug*“ Idee ist: KP1019 gelangt in die Zelle in einer größtenteils oxidierten Form. Ruthenium (Ru^{III}) wird möglicherweise durch GSH reduziert/koordiniert, was zu einer allgemeinen Reaktivitätsabnahme führt. Es werden jedoch im Gegensatz zu einem oxidierten, reaktiveren KP1019 vermehrt zytotoxische, bifunktionale Addukte ausgebildet. Mit anderen Worten: Die erhöhte Zytotoxizität von KP1019 könnte nach GSH-Reaktion nicht auf eine *schnellere* sondern auf eine unerwartet *andere* Art der DNA-Wechselwirkung zurückgeführt werden.

Die Adduktbildung von KP418 wurde unter dem Einfluss von GSH komplett inhibiert, was für eine ausschließlich komplexierende Eigenschaft (koordinative Bindung) von GSH in Gegenwart von KP418 im Vergleich zu KP1019 spricht.

KP1019 und KP418 stellen eine neue Klasse von Metallkomplexen dar, die mit großer Wahrscheinlichkeit einen anderen Reaktionsmechanismus als klassische Platinverbindungen haben. Wie weiter oben angedeutet, könnten zum Beispiel ihre Addukte mit der DNA von anderen Mechanismen als denen von Cisplatin prozessiert werden. Einen Hinweis auf die andere Prozessierung dieser DNA-Addukte lieferten in

der Tat Untersuchungen anderer Autoren (S. Metzger, B.K. Keppler, unveröffentlichte Ergebnisse), die zeigten, dass nicht nur durch die Inhibierung des Nukleotidexzisions-Reparatursystems (NER), sondern auch durch Inhibierung des Basenexzisions-Reparatursystems (BER) die Zytotoxizität von KP1019 anstieg. Dies ist insofern bemerkenswert, da Cisplatin durch die Inhibierung des BER-Systems keine höhere Zytotoxizität zeigt.

V: Die binukleare Verbindung Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)

Eigenschaften von ESS46 und Vorarbeiten

Die 1,2-intramolekulare Quervernetzung (QV) von Cisplatin gilt, wie in der Einleitung angesprochen, als eine für die Zytotoxizität verantwortliche Läsion. Allerdings konnte für Fanconi's Anämie Fibroblasten gezeigt werden, dass diese sensitiv gegenüber Cisplatin sind, obwohl sie intramolekulare QV effektiv reparieren können. Eine Möglichkeit dieses Phänomen zu erklären bestand in der Annahme, dass *intermolekulare* Addukte, die von diesen Zellen nicht repariert werden können, Grund für die Sensitivität gegenüber Cisplatin waren. Neuere Untersuchungen zeigten, dass intermolekulare QV, im Gegensatz zu den intramolekularen QV von Cisplatin, durch das Homologe Rekombinations-Reparatursystem entfernt werden [170,171]. Ein Fehlen dieses Reparatursystems sensitiviert Zellen gegenüber Cisplatin genauso stark wie das Fehlen des NER-Systems [171]. Die Erkenntnis, dass möglicherweise auch intermolekulare QV maßgeblich an der Zytotoxizität beteiligt sein könnten, führte zur Synthese von binuklearen Verbindungen, von denen angenommen wurde, dass sie aufgrund ihrer Struktur besonders viele intermolekulare QV ausbilden können [91,172-174]. Zu dieser Verbindungsreihe gehört auch Bisamid-bisplatin(II) (ESS46) (Abb. 46) [174].

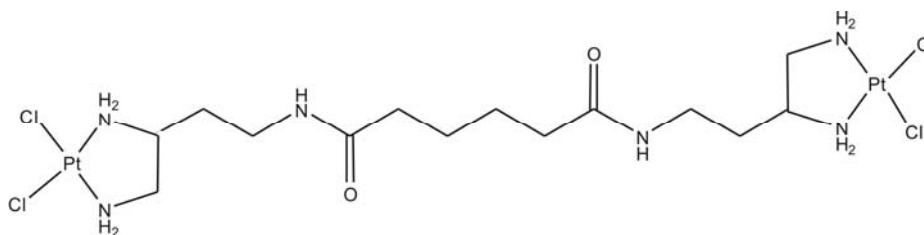


Abb. 46: Die binukleare Verbindung ESS46

In Vorarbeiten konnte für die Verbindung ESS46 eine hohe Reaktivität gegenüber DNA und in der Tat eine höhere Effizienz im Vergleich zu Cisplatin in der Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen gefunden werden [113]. Interessanterweise wurde für diesen Komplex ein IC₅₀-Wert von 105 µM in L1210 Zellen gefunden, was für wenig ausgeprägte zytotoxische Eigenschaften spricht (im Vgl.: Cisplatin-IC₅₀: 1,4 µM im gleichen Zellsystem). Dies bedeutet, dass die durch ESS46 gebildeten intermolekularen QV nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Zytotoxizität dieser Verbindung führten. Die Analyse der DNA-Sekundärstrukturveränderung zeigte, dass

ESS46 DNA ausschließlich aufdrillen aber nicht biegen kann [113]. Dies spricht dafür, dass die Verbindung ihre intermolekularen QV hauptsächlich über *monofunktionale* DNA-Addukte durch jeweils *eine* der Cisplatinsphären ausbildet. Die freien Bindungsstellen (eine pro Platinsphäre) von ESS46 könnten dann auch zur Quervernetzung von Proteinen mit der DNA zur Verfügung stehen. Um die Quervernetzungseigenschaften von ESS46 mit Proteinen zu untersuchen, wurde ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment mit ESS46 modifiziert und mit einem HeLa Gesamtzell-Proteinextrakt inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde zunächst über eine *native* Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt. DNA, an die Proteine gebunden haben, ergab im Gel mehrere retardierte Banden (= Protein-DNA-Komplexe), jedoch konnte zwischen platinierter und unplatinierter DNA kein Laufunterschied beobachtet werden. Um festzustellen, ob eine kovalente Protein-DNA-Verknüpfung vorlag, wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes auf einem *denaturierenden* SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nur Protein-DNA-Wechselwirkungen, bei denen das Protein kovalent über die Platinverbindung gebunden ist, bleiben unter diesen Bedingungen erhalten. Für ESS46 zeigte sich im SDS-Polyacrylamidgel die Ausbildung einer einzigen, prädominanten Bande, die nach vorheriger Proteinase-Behandlung oder Kochen des Extraktes verschwand. Dies spricht für eine DNA-Quervernetzung mit einem (einzelnen) Polypeptid, das als solches oder als Untereinheit eines Proteinkomplexes die Läsion *strukturspezifisch* erkennt. Die Bande konnte mit DNA, die nicht mit ESS46 modifiziert war, nicht erhalten werden; das bedeutet, dass diese Quervernetzung über ESS46 erfolgte. Interessanterweise konnte diese Beobachtung auch für weitere Platin-Verbindungen, die hohe IC₅₀-Werte aufwiesen, gemacht werden. Auf der anderen Seite wurde im verwendeten SDS-Gelsystem für ausgesprochen zytotoxische Verbindungen, wie z.B. Cisplatin, keine Protein-DNA-Quervernetzung erhalten (Dissertation Stefan Wild).

Diese Ergebnisse führten zur folgenden Arbeitshypothese: Das Protein könnte entweder Bestandteil eines Reparatursystems sein, und z. B. durch die Bindung an die durch zytotoxisch inaktive Platinkomplexe verursachte DNA-Läsion ein Signal zur Reparatur einleiten, oder die Struktur wird von einem Protein im Extrakt zufällig erkannt, ohne dass dies im Zusammenhang mit einem Reparatursystem steht. Die Relevanz des ersten Falls für die zelluläre Prozessierung von Platinderivaten ist offensichtlich; im zweiten Fall hätte man ein "Indikator-Protein" für DNA-

Strukturveränderungen, die von einer Platinderivat-Klasse induziert werden. Deshalb erschien es zweckmäßig, dieses Protein zu identifizieren.

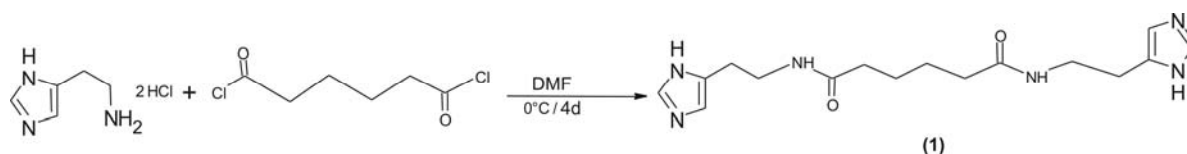
Ziel dieses Abschnittes

Aufgabe dieses Arbeitsabschnittes war die Neusynthese von Bisamid-bisplatin(II) (ESS46), die Herstellung eines neuen HeLa-Gesamtzellextraktes, die Reproduktion und Optimierung der Protein-DNA-Quervernetzung, die Isolierung des quervernetzten Proteins und dessen Identifizierung.

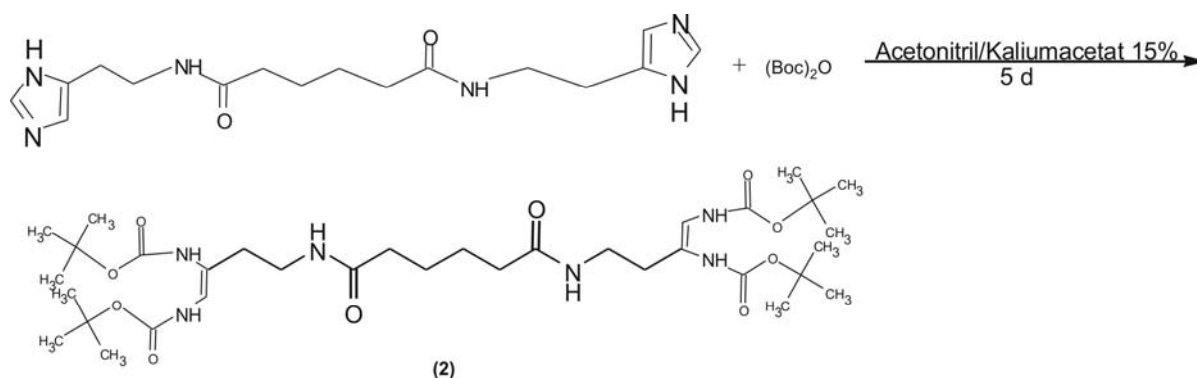
Ergebnisse

1. Synthese von Bisamid-bisplatin(II) (ESS46)

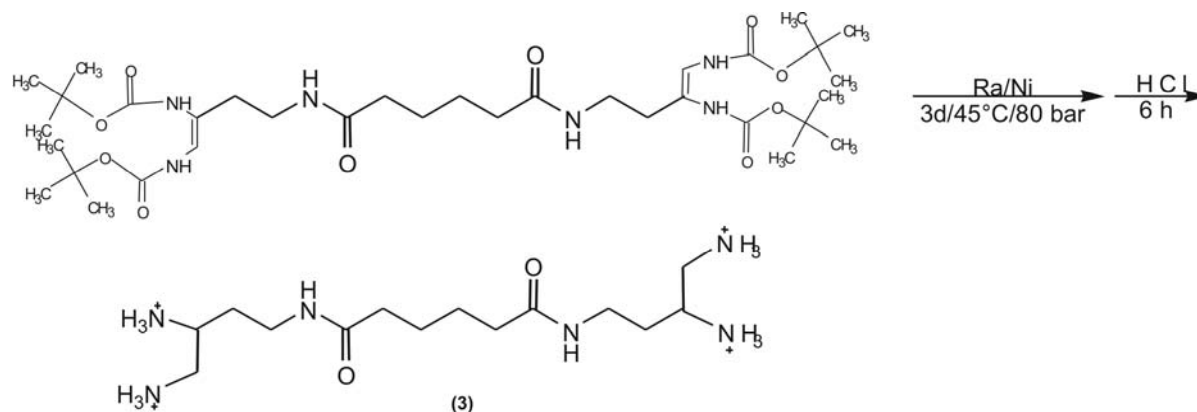
Im Material und Methoden Teil wurde die Synthese mit allen analytischen Daten ausführlich besprochen. Hier soll nur ein kurzer Überblick über die einzelnen Syntheseschritte mit den entsprechenden Reaktionsgleichungen gegeben werden: Im ersten Schritt der Synthese wurde durch die Reaktion von 2 Histaminmolekülen mit Adipoyldichlorid das erste Zwischenprodukt, die Bisamidverbindung (*N*, *N'*-Adipoylbis(histamin)) (**1**) gebildet. Die Charakterisierung der Verbindung (**1**) erfolgte mittels $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD}/\text{D}_2\text{O}$).



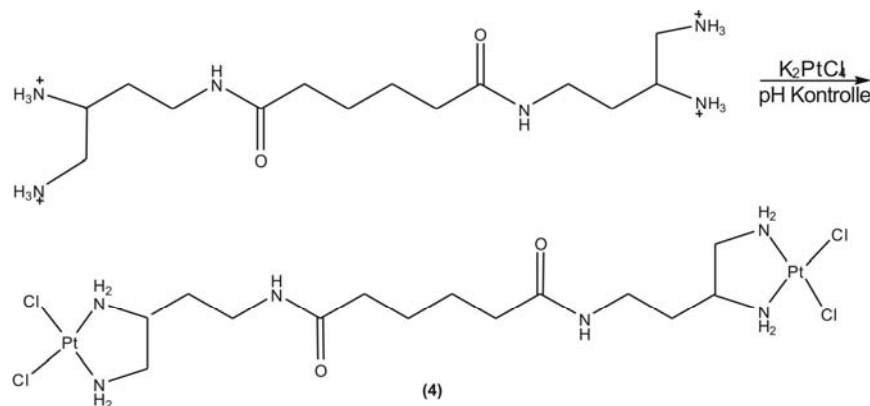
Die Ringöffnung des Imidazolrings von Histamin wurde mit di-*tert*-Butyldicarbonat erreicht, was gleichzeitig zur Einführung von Boc-Schutzgruppen an den endständigen Amingruppen führte und das Zwischenprodukt (**2**) lieferte.



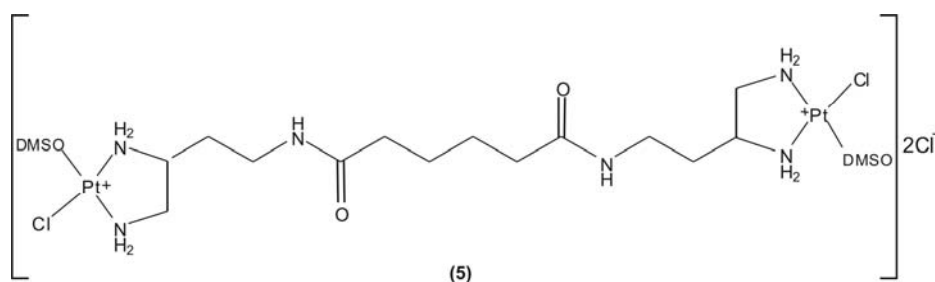
Die Hydrierung der Doppelbindung von Zwischenprodukt **(2)** erfolgte mit $\text{H}_2/\text{Raney-Nickel}$. N^4, N^4 -Adipoylbis(1,2,4-triaminobutan)tetrahydrochlorid **(3)** wurde durch Entfernung der Boc-Schutzgruppen mit wasserfreier Salzsäure in Ethanol erhalten und mittels NMR-Analyse die Identität von **(3)** festgestellt.



N^4, N^4 -Adipoylbis(1,2,4-triaminobutan)tetrahydrochlorid **(3)** wurde mit 2 Äquivalenten Kaliumtetrachloroplatinat in Wasser bei 70°C versetzt. Um eine Ausbildung von weißem Tetraminplatin(II) bei pH Werten $> 7,0$ zu verhindern, wurde der pH ständig kontrolliert und am Ende der Reaktion mit Natriumhydroxid-Lösung auf pH 5,0 eingestellt. Nach einiger Zeit fiel das gelb-orange Endprodukt *cis*-Adipinsäure-bis [(1,2-diaminobut-4-yl) amid]dichloro-platinum(II) **(4)** aus.



Zur analytischen Bestimmung durch ^{13}C -NMR wurde der Komplex **(4)** in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Messung erfolgte nicht sofort nach Auflösung der Substanz, so dass das erhaltene Spektrum bereits die Verbindung mit DMSO Liganden zeigte **(5)** $[(\text{DMSO})(\text{Cl})\text{Pt}(\text{LL})-\text{Pt}(\text{Cl})(\text{DMSO})]\text{Cl}_2$, wobei auf jeder Seite der Verbindung jeweils ein Chlorid gegen DMSO ausgetauscht wurde.



2. Präparation des HeLa-Gesamtzell-Proteinextrakts

Die Herstellung des HeLa-Gesamtzellextraktes nach Manley [175] lieferte 1,95 µg Protein/µl was einer Gesamtausbeute von 5,5 mg Protein entsprach. Der Proteinextrakt wurde über ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel analysiert (s. Material und Methoden).

3. Optimierung der Bedingungen für die Protein-DNA-Quervernetzung

Nach erfolgreicher Synthese von ESS46 sollte die Protein-DNA-Quervernetzung (QV) reproduziert werden. Diese Wiederholung unter eigentlich schon gegebenen Bedingungen stellte sich als äußerst schwierig heraus. Erst die Präparation eines neuen HeLa-Gesamtzellextrakts, die Optimierungen des Bindungspuffers, des DNA-Modifikationsgrads, der DNA- und Proteinmengen und der Auftragspufferbedingungen machten die Reproduktion der QV mit ausreichend guter Qualität möglich. Im Folgenden soll der Weg zur Darstellung der Protein-DNA-QV kurz beschrieben werden.

In Abb. 47 sind die ersten Versuche der Protein-DNA-QV im nativen als auch im SDS-Polyacrylamidgel zu sehen. Für die QV wurde das mit ESS46 modifizierte radioaktiv endmarkierte 177 bp DNA-Fragment in Anwesenheit eines Bindungspuffers (BP) und mit frisch präparierten HeLa-Gesamtzellextrakt für 1 h bei 30°C inkubiert. Je ein Aliquot des Ansatzes wurde auf einem nativen und auf einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Wie zu sehen ist, bildeten sich unter den ursprünglich gewählten Bedingungen weder im nativen noch im SDS-Gel diskrete Protein-DNA-Banden aus.

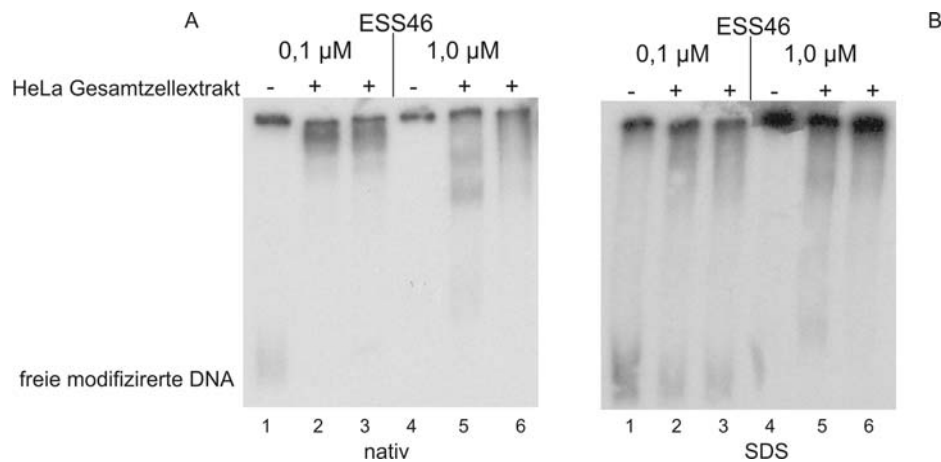


Abb. 47: Autoradiogramm eines 4% nativen (A) und 4% SDS-Polyacrylamidgels (B) nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemischs (inkubiert 1 h bei 30°C) bestehend aus radioaktiv endmarkierten 177 bp DNA-Fragment modifiziert mit 0,1 µM ESS46 oder 1 µM ESS46 und HeLa-Gesamtzellextrakt. Bahnen 2, 3: DNA modifiziert mit 0,1 µM ESS46, inkubiert mit 0,8 µg bzw. 1,5 µg Gesamtzellextrakt; Bahnen 5, 6: DNA modifiziert mit 1 µM ESS46, inkubiert mit 0,8 µg bzw. 1,5 µg Gesamtzellextrakt. Bahnen 1 und 4: DNA mit 0,1 µM bzw. 1 µM ESS46 modifiziert, ohne Protein inkubiert.

Um die Bindungsbedingungen zu optimieren, wurden im ersten Schritt verschiedene Bindungspuffer analysiert. Die Ergebnisse der Analyse unter Verwendung der Puffer P1 und P2 (Zusammensetzung s. Material und Methoden) im Vergleich zum ursprünglichen Bindungspuffer BP und die daraus resultierenden Protein-DNA-Komplexe im nativen und im SDS-Polyacrylamidgel sind in Abb. 48 dargestellt. Wie zu sehen ist, bildeten sich nun mehrere Banden im nativen PAA-Gel aus, die alle eine oder mehrere Protein-DNA-Wechselwirkungen repräsentierten. Im korrespondierenden SDS-Gel wurden die Unterschiede der verwendeten Puffer noch deutlicher: Bahn 4 (B) zeigte hier analog der Bahn 4 im nativen Gel (A) im Vergleich zu den anderen Ergebnissen am wenigsten Hintergrund. Auch wurde auf Höhe der zu erwartenden kovalenten QV nun eine Bande sichtbar (s. Pfeil). Der entsprechende Bindungspuffer mit dem das beste Ergebnis erzielt wurde enthielt 100 mM NaCl im Vergleich zu P1 mit nur 60 mM NaCl und BP mit 60 mM KCl. In allen weiteren Untersuchungen wurde das Reaktionsgemisch in Puffer P2 inkubiert.

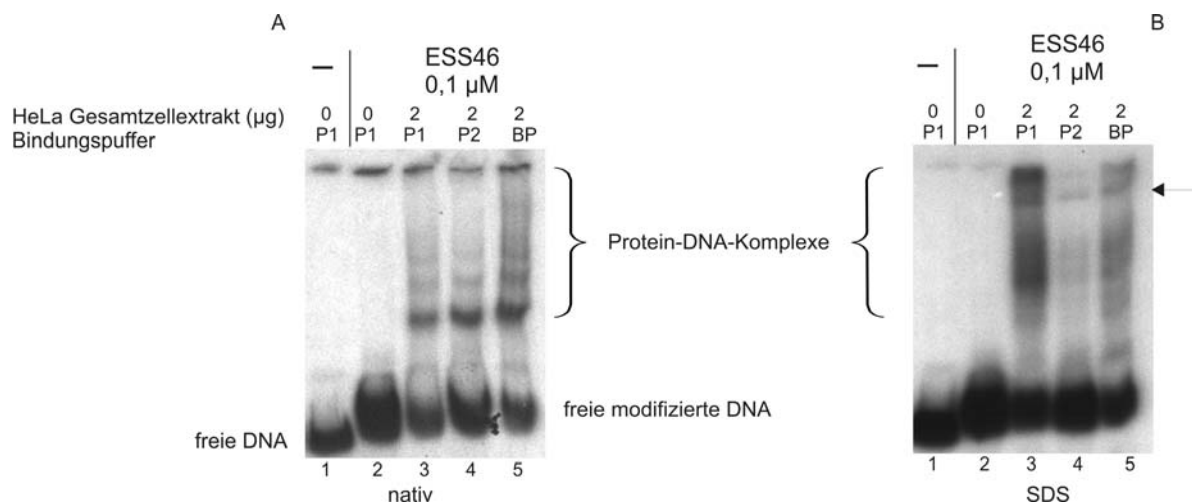


Abb. 48: Autoradiogramm eines 4% nativen (A) und 4% SDS-Polyacrylamidgels (B) nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemischs (inkubiert 1 h bei 30°C) bestehend aus radioaktiv endmarkierten 177 bp DNA-Fragment modifiziert mit 0,1 μM ESS46 und 2 μg HeLa-Gesamtzellextrakt. Bahn 1: nicht modifizierte DNA, inkubiert in Puffer P1; Bahn 2: modifizierte DNA inkubiert in Puffer P1; Bahn 3 modifizierte DNA inkubiert mit 2 μg Gesamtzellextrakt in Puffer P1; Bahn 4: modifizierte DNA inkubiert mit 2 μg Gesamtzellextrakt in Puffer P2, Bahn 5: modifizierte DNA inkubiert mit 2 μg Gesamtzellextrakt in Puffer BP.

Trotzdem war die Veränderung der Bindungspufferbedingungen nicht ausreichend, um eine hintergrundfreie Bande darzustellen. In den darauf folgenden Schritten wurden Versuche zur Bestimmung der optimalen Proteinmengen und Analysen zur optimalen Modifikation der DNA mit ESS46 unternommen. Nach mehreren Analysen stellte sich die Verwendung einer mit 5 μM ESS46 modifizierten DNA und Proteinmengen von 0,5-1,5 μg als gute Voraussetzung für die Darstellung der Protein-DNA-QV im SDS-Gel heraus. In Abb. 49 ist das Ergebnis dieser Optimierungsversuche im nativen und SDS-Gel abgebildet.

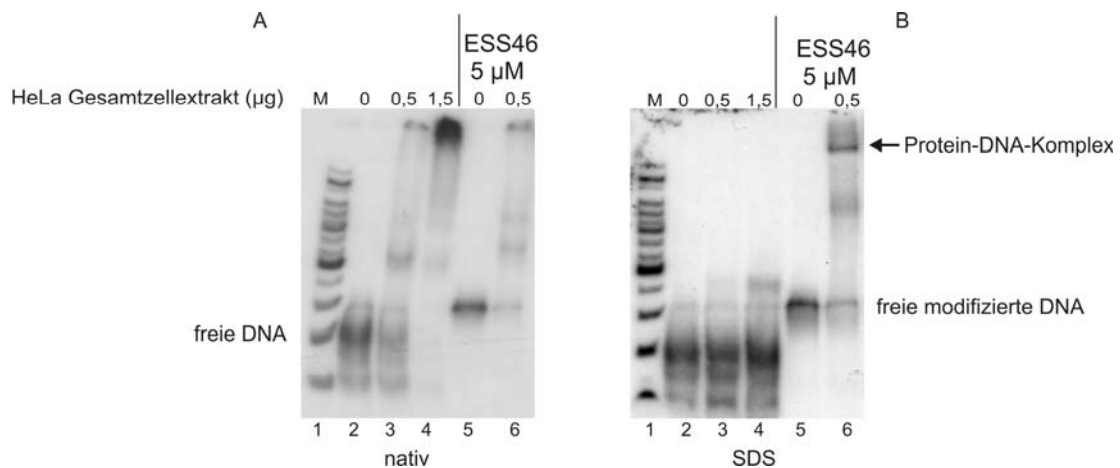


Abb. 49: Autoradiogramm eines 4% nativen (A) und 4% SDS-Polyacrylamidgels (B) nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemischs (inkubiert 1 h bei 30°C) bestehend aus radioaktiv endmarkiertem 177 bp DNA-Fragment modifiziert mit 5 µM ESS46 und HeLa-Gesamtzellextrakt. Bahn 2: nicht modifizierte DNA; Bahn 3: nicht modifizierte DNA mit 0,5 µg Gesamtzellextrakt; Bahn 4: nicht modifizierte DNA inkubiert mit 1,5 µg Gesamtzellextrakt; Bahn 5: modifizierte DNA; Bahn 6: modifizierte DNA inkubiert mit 0,5 µg Gesamtzellextrakt; Bahn 1: radioaktiv markierter 100 bp DNA-Marker.

Die Bahnen 2 und 3 im nativen (A) und SDS-Gel (B) repräsentieren die Reaktion von nicht modifizierter DNA mit HeLa-Gesamtzellextrakt, die Bahn 6 in beiden Gelanalysen die Reaktion von mit ESS46 modifizierter DNA und Gesamtzellextrakt. Es ist deutlich zu erkennen, dass nicht-platinierter DNA im nativen Gel ähnliche Protein-DNA-Komplexe ausbildete wie platinierter, aber im SDS-Gel keine Wechselwirkung von DNA und Protein zu detektieren war. Im Gegensatz dazu zeigte eine mit 5 µM ESS46 platinierter DNA, die mit HeLa-Gesamtzellextrakt inkubiert wurde, nach Auftrennung im SDS-Gel eine deutliche Ausbildung eines Protein-DNA-Komplexes. Die Qualität dieser QV wurde im Gegensatz zum vorherigen Ansatz (Abb. 48) noch einmal deutlich verbessert, bei der eine Modifikation von 0,1 µM und eine HeLa-Gesamtzellextraktmenge von 2 µg verwendet wurde.

Eine zusätzliche Verringerung des Hintergrunds konnte durch die folgende Änderung der Bedingungen erreicht werden: Bei den bisher gezeigten Analysen wurde das für die SDS-Gelelektrophorese verwendete Aliquot im SDS-haltigen „Blue Juice“-Probenpuffer aufgenommen, aber ohne vorheriges Aufkochen auf das Gel aufgetragen. Wie die Bahn 7 in Abb. 50 zeigt konnte ein zusätzliches Aufkochen des Ansatzes für 3 Minuten bei 95°C eine deutliche Reduktion des Bandenhintergrunds bewirken. Keine zusätzliche Verbesserung konnte durch den Austausch des „Blue Juice“ Auftragspuffers mit einem DTT-haltigen Auftragspuffer erreicht werden (Bahn

6). Mit diesem Puffer und mit Aufkochen des Reaktionsgemisches konnte jedoch der Hintergrund auch nochmals deutlich reduziert werden (Bahn 5).

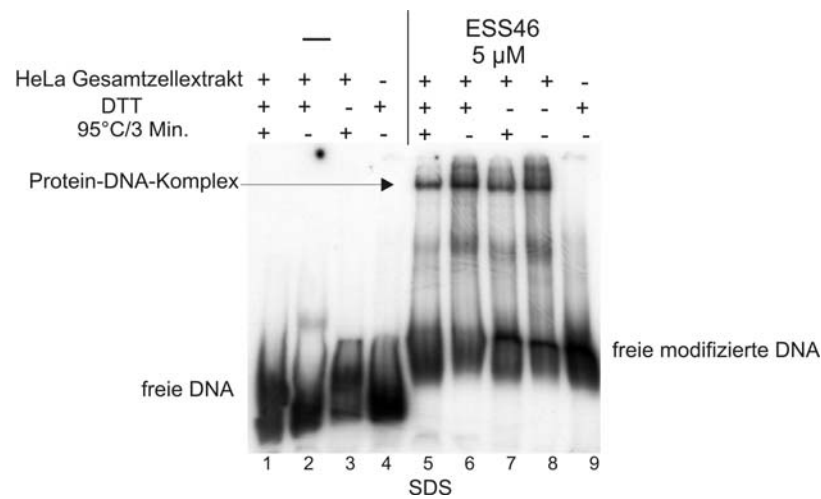


Abb. 50: Autoradiogramm eines 4% SDS-Polyacrylamidgels nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemisches bestehend aus radioaktiv endmarkierten 177 bp DNA-Fragment modifiziert mit 5 µM ESS46 und 0,75 µg HeLa-Gesamtzellextrakt nach Inkubation bei 30°C für 1 h. Bahn 1: nicht modifizierte DNA, 0,75 µg Gesamtzellextrakt, DTT-haltiger Auftragspuffer, 3 Min bei 95°C erhitzt; Bahn 2: nicht modifizierte DNA mit 0,75 µg Gesamtzellextrakt DTT-haltiger Auftragspuffer; Bahn 3: nicht modifizierte DNA mit 0,75 µg Gesamtzellextrakt, „Blue Juice“ (BJ) Auftragspuffer, 3 Min. bei 95°C erhitzt; Bahn 5: modifizierte DNA mit 0,75 µg Gesamtzellextrakt, DTT-haltiger Auftragspuffer, 3 Min bei 95°C erhitzt, Bahn 6: modifizierte DNA mit 0,75 µg Gesamtzellextrakt DTT-haltiger Auftragspuffer; Bahn 7: modifizierte DNA mit 0,75 µg Gesamtzellextrakt „BJ“ Auftragspuffer, 3 Min. bei 95°C erhitzt; Bahn 8: modifizierte DNA mit 0,75 µg Gesamtzellextrakt „BJ“ Auftragspuffer; Bahn 9: modifizierte DNA

4. Versuch der Isolierung der Protein-DNA-Spezies durch isopyknische Ultrazentrifugation (UZ)

Die praktisch hintergrundfreie Darstellung der Protein-DNA-Quervernetzung im SDS-Polyacrylamidgel stellte nun eine gute Voraussetzung zur Isolierung dieser Spezies dar. Nach Isolierung des quervernetzten Proteins, sollte seine Identität mittels Massenspektrometrie festgestellt werden.

Der erste Versuch zur Isolierung bestand in der Anwendung der isopyknischen Ultrazentrifugation (UZ). Die theoretische Annahme zur erfolgreichen Isolierung der Protein-DNA-Spezies bestand in der folgenden Überlegung: Mit der isopyknischen UZ in einem Cäsiumchloridgradienten können Makromoleküle auf Grund ihrer unterschiedlichen Dichten getrennt und somit isoliert werden. Durch die Verwendung einer Cäsiumchloridlösung mit einer Ausgangsdichte von 1,5 mg/ml reichert sich freie DNA mit einer mittleren Dichte von 1,7 mg/ml am unteren Ende des Zentrifugenröhrchens, Proteine mit einer mittleren Dichte von 1,3 mg/ml am oberen Ende des Zentrifugenröhrchens an. Eine Mischspezies aus DNA und Protein würde sich in der Mitte des Gradienten sammeln bei einer angenommenen mittleren Dichte von 1,5 mg/ml. Durch die kovalente Quervernetzung des Proteins mit DNA über die Platinverbindung sollte nur diese Spezies unter den Bedingungen einer Ultrazentrifugation stabil sein. Der Vorteil dieser Art der Isolierung wäre, dass das Protein in Lösung vorläge, und das System eine einfache Methode zur Isolierung größerer Mengen an DNA-Protein-Komplex darstellen könnte. Vor der UZ wurde die Inkubation nach den ermittelten Standardbedingungen durchgeführt, wobei die Mengen verzehnfacht wurden. Das Reaktionsgemisch wurde für 21 Stunden bei 65000 rpm zentrifugiert, und nach beendeter Zentrifugation wurden 72 Fraktionen gesammelt. Durch die radioaktive Markierung des eingesetzten DNA-Fragments konnte der Verbleib der DNA über Szintillationsmessung verfolgt werden. Die Ergebnisse der Szintillationsmessung der 72 gesammelten Fraktionen nach durchgeführter Zentrifugation, sind in Abb. 51 A dargestellt. Wie erwartet, zeigte das Elutionsprofil, dass die freie radioaktiv markierte DNA mit den ersten Fraktionen entnommen werden konnte; DNA reicherte sich also im unteren Bereich des Gradienten an (Fraktionen 2-12). Im mittleren Bereich des Profils, der eigentlich den Protein-DNA-Komplex enthalten sollte, konnte keine Radioaktivität gemessen werden. Dafür wurde am Ende des Elutionsprofils durch Szintillationsmessung

wiederum Radioaktivität gemessen. Dies war ein Hinweis darauf, dass tatsächlich eine Auftrennung stattgefunden hat.

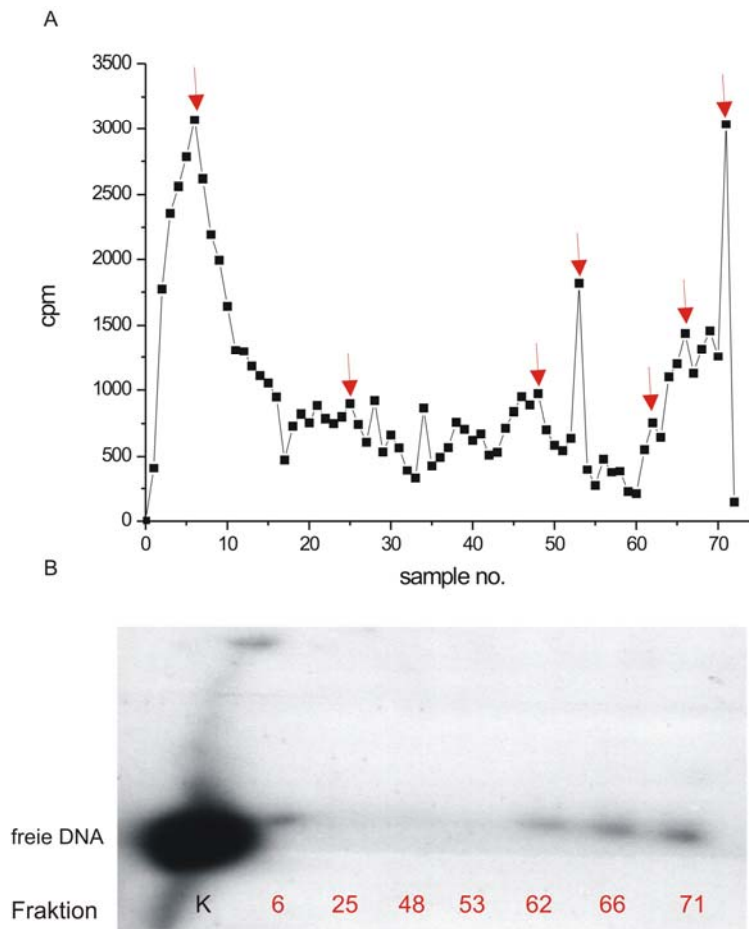


Abb. 51 A: Ergebnis der Szintillationsmessung in cpm der gesammelten Fraktionen nach UZ des Reaktionsgemisches bestehend aus modifiziertem (5 μ M ESS46) radioaktiv markiertem 177 bp DNA-Fragment und HeLa-Gesamtzellextrakt. B: Autoradiogramm eines 4% Polyacrylamidgels mit ausgewählten Aliquoten aus A (rote Pfeile).

Die gesammelten Fraktionen wurden in einem Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 51 B). Die in den vorderen Fraktionen detektierte Radioaktivität ist – der Theorie entsprechend – freie DNA. Überraschenderweise zeigte aber die Analyse der späteren Fraktionen (Fraktionen 62-71) nicht den Protein-DNA-Komplex, sondern ebenfalls nur freie DNA. Eine mögliche, wenn auch nicht nachgeprüfte Erklärung für dieses unerwartete Phänomen ist die folgende: Da nach der Theorie freie DNA nur in den vorderen Fraktionen angereichert werden kann, könnte die in den späteren Fraktionen identifizierte DNA mit einem Protein komplexiert gewesen sein. Dieser Komplex war über einige Zeit der Zentrifugation stabil, zerfiel aber dann in die Bestandteile Protein und DNA. Die dadurch freigesetzte DNA hatte aber nicht mehr die Möglichkeit während der verbliebenen Zeit der Zentrifugation in den Bereich ihrer

eigentlichen Dichte zu gelangen, was zur Anreicherung in Bereichen höherer Dichte führte.

Da die Anreicherung des Komplexes über die isopyknische UZ fehlgeschlagen war, galt der nächste Versuch der direkten Isolierung der Protein-DNA-Bande aus dem SDS-Gel.

5. Isolierung des Protein-DNA-Komplexes über Bandenelution und nachfolgender Identifizierung des Proteins über Massenspektrometrie

Vor der Identifizierung des quervernetzten Proteins über Massenspektrometrie musste die entsprechende Protein-DNA-Bande aus dem SDS-Gel ausgeschnitten werden. Dazu musste sichergestellt werden, dass sich möglichst wenig andere Proteine auf der Höhe des auszuschneidenden Bereiches befinden. Da eine direkte Silberfärbung des Protein-DNA-Komplexes wegen der zu geringen Menge nicht möglich war, und eine Inkubation mit mehr als 1,5 µg HeLa Gesamtzellextrakt zu einer Überladung der Bahnen führte, wurden ansteigende Mengen des HeLa-Gesamtzellextraktes ohne DNA auf einem 4% SDS-Polyacrylamidgel analysiert und die Proteine mit Silber angefärbt. Das Ergebnis ist in Abb. 52 gezeigt. Wie zu erkennen ist, können durch die Verwendung eines nur 4% SDS-Polyacrylamidgels, wie es zur Analyse der Protein-DNA-QV verwendet wurde, die meisten Proteine auf Höhe der zu isolierenden Bande abgereichert werden. Bei Verwendung von Proteinmengen, die für das QV-Experiment mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse eingesetzt wurden (1,5 µg) konnte mit der Silberfärbung kein Protein mehr nachgewiesen werden (Bahn 2 mit 1,5 µg Gesamtzellextrakt). Man kann eine Kontamination mit Proteinen, die auf gleicher Höhe mit dem Protein-DNA-Komplex nicht vollkommen ausschließen, aber wie das silbergefärbte Gel zeigt, konnte die Gefahr von *großen Mengen* kontaminierender Proteine zumindest minimiert werden. Um mögliche Hintergrund-Proteine während der massenspektrometrischen Analyse zu identifizieren und damit von dem quervernetzten Protein zu unterscheiden, wurde Proteinextrakt ohne DNA auf einem Gel aufgetrennt, und auf Höhe der Protein-DNA-QV eine entsprechende Menge an Banden ausgeschnitten. Diese wurden der gleichen Aufarbeitung vor der massenspektrometrischen Messung wie die eigentliche Probe unterzogen.

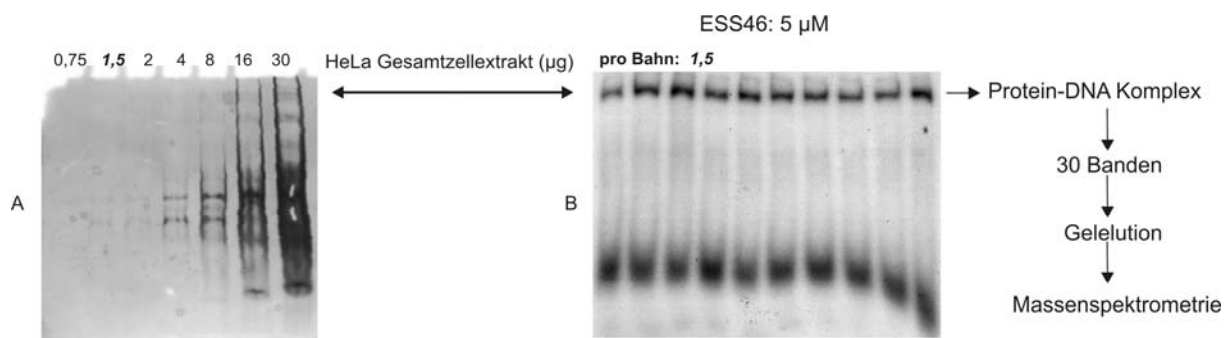


Abb. 52 A: Silbergefärbtes 4% SDS-Polyacrylamidgel mit ansteigenden Mengen an HeLa-Gesamtzellextrakt (Bahnen 1-7; 0,75-30 µg); B: Autoradiogramm eines 4% SDS-Polyacrylamidgels nach elektrophoretischer Auftrennung des Reaktionsgemischs bestehend aus radioaktiv endmarkierten 177 bp DNA-Fragment, modifiziert mit 5 µM ESS46 und 1,5 µg HeLa Gesamtzell Proteinextrakt (Auftragung des kompletten Ansatzes, s. Material und Methoden) nach Inkubation bei 30°C für 1 h.

Bei der Quervernetzung wurde mit sehr geringen Mengen an HeLa-Gesamtzellextrakt gearbeitet, und die Protein-DNA-Bande war nur über autoradiografische Detektion der beteiligten radioaktiv markierten DNA zu detektieren. Deswegen musste sichergestellt werden, dass ausreichend quervernetztes Protein für die massenspektrometrische Analyse zur Verfügung steht. Durch ein einfaches Verfahren konnte die relative Menge an retardierter DNA zu nicht retardierter DNA bei den Quervernetzungsuntersuchungen bestimmt werden. Dabei geht man davon aus, dass die molare Menge an retardierter DNA in etwa der molaren Menge an gebundenem Protein entspricht. Die Proteinmenge, die durch dieses Verfahren berechnet wurde, entsprach ca. 8,6 fmol Protein pro retardierte Bande (s. Material und Methoden).

Um ausreichende Mengen an quervernetztem Protein sicherzustellen wurden 30 Banden (= ca. 260 fmol) aus einem SDS-Gel ausgeschnitten (Abb. 52 B), vereinigt und für die massenspektrometrische Analyse vorbereitet. Die in den Gelen enthaltenen Proteine wurden einer In-Gel Spaltung mit Trypsin unterzogen, und die erhaltenen Peptide durch LC-MS/MS („liquid chromatography-tandem mass spectrometry“) durch ein ESI-Q-TOF (electrospray ionization/quadrupole/time-of-flight) Massenspektrometer bestimmt. Tryptische Peptide, die in einer Q-TOF für die MS/MS-Analyse fragmentiert werden, brechen hauptsächlich an ihren Peptidbindungen, was zur Bildung von b- und y-Ionen führt. Diese entsprechen unterschiedlich langen N-terminalen (b-Ionen) bzw. C-terminalen (y-Ionen) Fragmenten (Abb. 53).

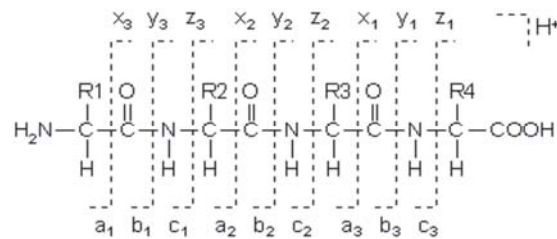


Abb. 53: Mögliche Fragmentionen nach massenspektrometrischer Aufspaltung.

Auf Grundlage der Massen der Peptide sowie deren identifizierten b- und y-Ionen kann mit Hilfe des Mascot-Programms eine Suche in der gewünschten Datenbank gestartet werden (hier: NCBI nr, Homo sapiens). Diese Suche ermittelt an Hand der massenspektrometrischen Daten die möglichen Proteinkandidaten, die aufgelistet und mit einer Punktzahl („total ion score“) versehen werden. Die Punktzahl setzt sich zusammen aus den sog. „ion scores“, die jedem identifizierten Peptid zugeordnet werden. Diese Zahl gibt einen Hinweis darauf, wie zuverlässig die Identifizierung eines Peptids aufgrund der ermittelten Daten ist.

Den erhaltenen Spektren aus den MS/MS-Analysen konnten 3 Peptide zugeordnet werden. Mascot gab für den Suchlauf der Peptide des quervernetzten Proteins einen Wert von 36 an, ab dem die Identifizierung eines Peptids oder Proteins für diese Messung als zuverlässig betrachtet wird. Bei einem Wert von 36 liegt die Wahrscheinlichkeit einer „falsch positiven“ Identifikation bei 0,05%. Je höher dieser Wert ist, desto geringer ist die Wahrscheinlichkeit, einer falsch positiven Identifikation. Bei einem score von z.B. 46 würde diese Wahrscheinlichkeit auf 0,005% sinken. Der „total ion score“ eines Proteins ist umso höher, je mehr Peptide dieses Proteins identifiziert werden können und je höher ihre „ion scores“ sind. Die entsprechenden MS/MS-Spektren sowie Tabellen der identifizierten (rot) y- und b-Ionen der jeweiligen Peptide sind in den Abbildungen 54-56 dargestellt. Zwei der identifizierten Peptide („ion scores“ = 55 bzw. 49) konnten einem „ARF binding protein 1“ („total ion score“ = 104), welches ausgeprägte Homologien zu einem „upstream regulatory element binding protein 1“ aufweist, zugeordnet werden. Das dritte identifizierte Peptid („ion score“ = 65) konnte 3 verschiedenen Proteinen zugeordnet werden: einem hypothetischen Protein, dem „FAM44A“-Protein und dem Protein „Family with sequence similarity 44 member A“. Die Tabelle 9 soll einen Überblick über die identifizierten Proteine geben. Tabelle 10 führt die relevanten Daten der identifizierten Proteine auf.

Protein	MG (Da)
ARF-binding Protein 1 (ARF-BP1)	485,539
Upstream regulatory element binding protein 1 (UREB1)	485,523
Hypothetisches Protein	55,196
FAM44A	36,466
Family with sequence similarity 44, member A	332,433

Tab. 9: Übersicht der identifizierten Proteine und deren Molekulargewicht (MG).

Die Kontrollmessung des Hintergrunds (nur Proteinextrakt, keine DNA), konnte keines dieser Proteine aufzeigen. Dafür konnte ein identifiziertes Peptid („ion score“ = 63) dem Aktin Bindeprotein 278, und ein weiteres identifiziertes Peptid („ion score“ = 56) dem Aktin Bindeprotein 280 zugeordnet werden (MS/MS-Spektren nicht gezeigt). Auch bei der Analyse des quervernetzten Proteins konnte ein Peptid des Aktin Bindeproteins 280 identifiziert werden, allerdings mit einem „ion score“ von nur 30 (MS/MS-Spektren nicht gezeigt).

Für eine nochmalige Analyse des quervernetzten Proteins und der Kontrollmessung wurde der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Leider konnten beide Versuche im Rahmen dieser Dissertation nicht ausgewertet werden, da es während des Messvorgangs zu technischen Problemen mit den vorgeschalteten Chromatographiesäulen kam.

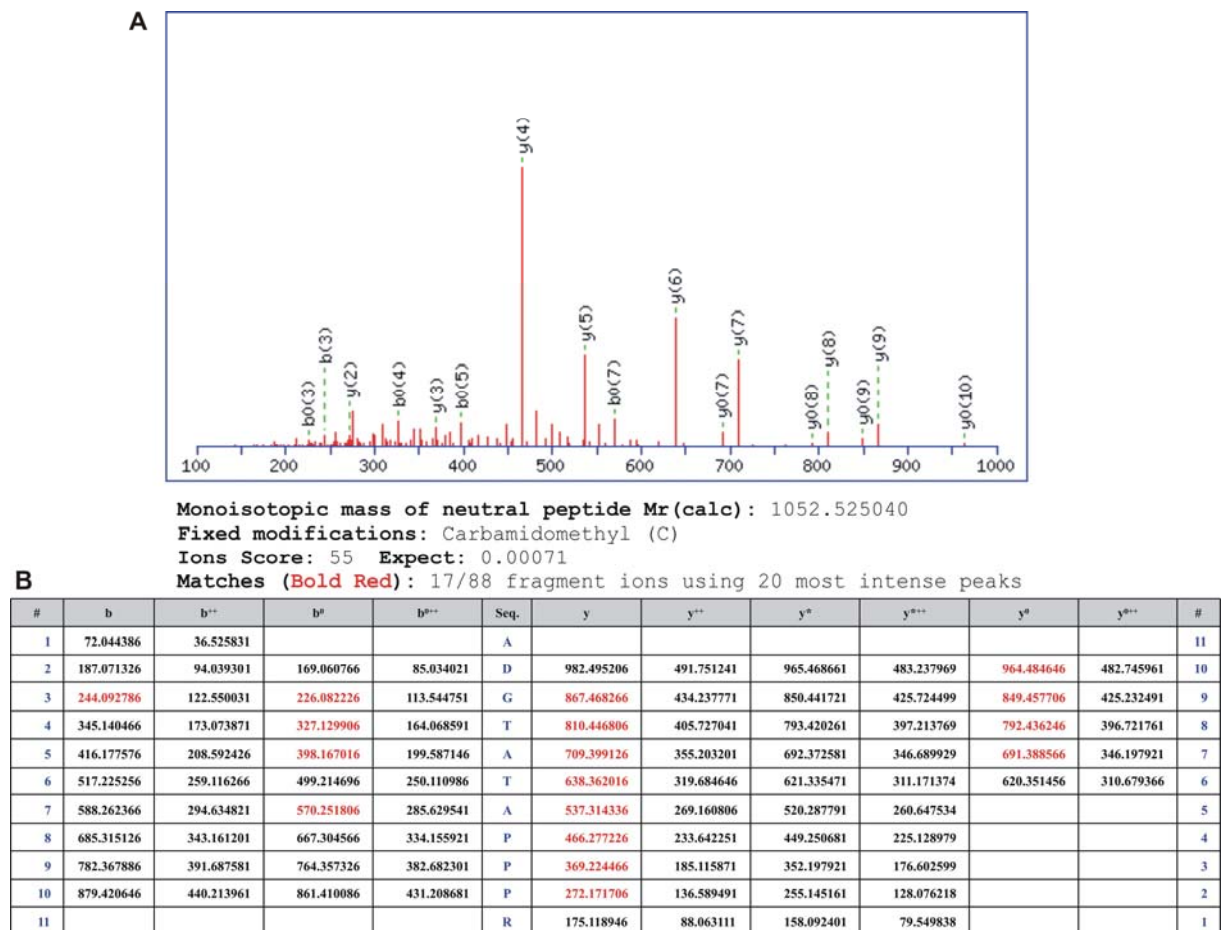
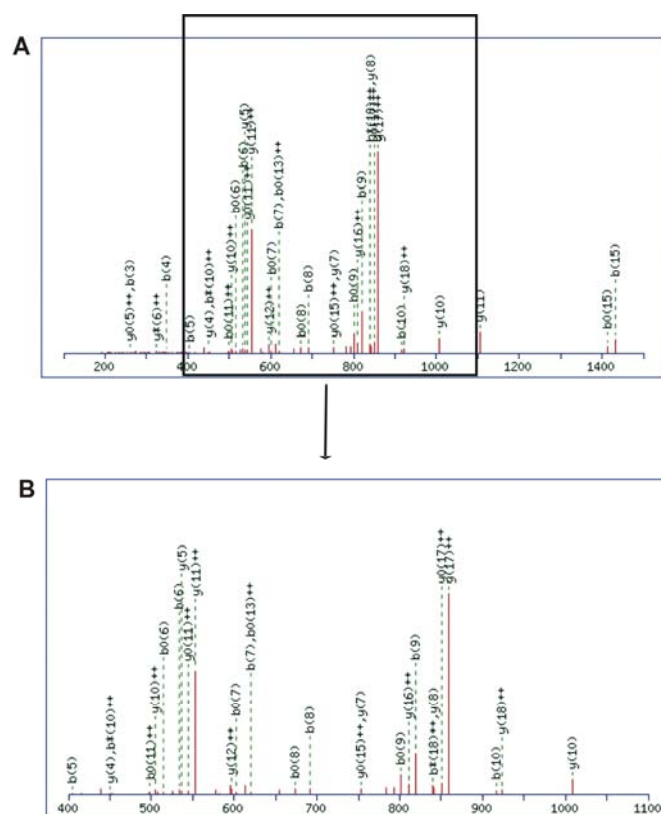


Abb. 54 **A**: MS/MS Spektrum und **B**: Tabelle der identifizierten b- und y-Ionen (rot) eines Peptids aus „ARF-BP1“ bzw. „UREB1“ (Tabelle und MS/MS Spektrum wurden der Ergebnisseite des Mascot Suchprogramms entnommen).



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 2535.048035

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

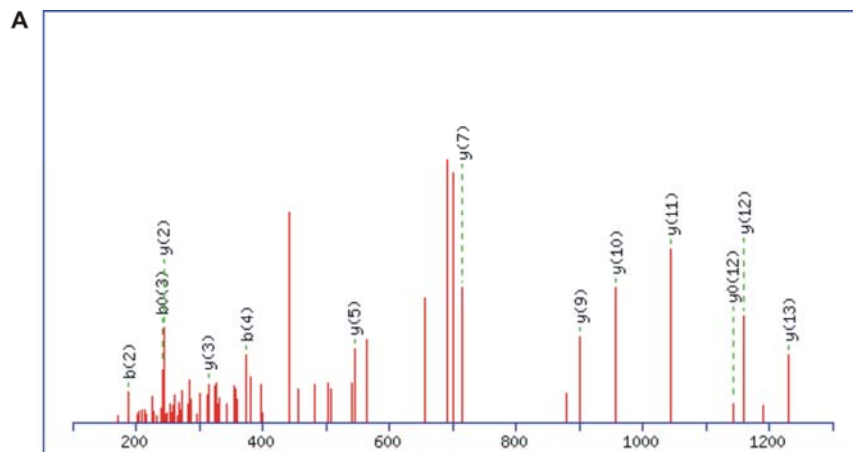
Ions Score: 49 Expect: 0.0017

Matches (Bold Red): 35/282 fragment ions using 60 most intense peaks

C

#	b	b ⁺⁺	b ⁺	b ⁺⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	88.039306	44.523291			70.028746	35.518011	S							26
2	203.066246	102.036761			185.055086	93.031481	D	2449.023306	1225.015291	2431.996761	1216.502018	2431.012746	1216.010011	25
3	260.087706	130.547491			242.077146	121.542211	G	2333.996366	1167.501821	2316.99821	1158.988548	2315.985806	1158.496541	24
4	347.119730	174.063506			329.109176	165.058226	S	2276.974906	1138.991091	2259.948361	1130.477818	2258.964346	1129.985811	23
5	404.141196	202.574236			386.130636	193.568956	G	2189.942876	1095.475076	2172.916331	1086.961803	2171.932316	1086.469796	22
6	533.183786	267.095531			515.173226	258.090251	E	2132.921416	1066.964346	2115.894871	1058.451073	2114.910856	1057.959066	21
7	620.215816	310.611546			602.205256	301.606266	S	2003.878826	1002.443051	1986.852281	993.929779	1985.868266	993.437771	20
8	691.252926	346.130101			673.242366	337.124821	A	1916.846796	958.927036	1899.820251	950.413764	1898.836236	949.921756	19
9	819.311506	410.159391	802.284961	401.646119	801.300946	401.154111	Q	1845.809686	923.408481	1828.783141	914.895209	1827.799126	914.403201	18
10	916.364266	458.685771	899.337721	450.172499	898.353706	449.680491	P	1717.751106	859.379191	1700.724561	850.865919	1699.740546	850.373911	17
11	1013.417026	507.212151	996.390481	498.698879	995.406466	498.206871	P	1620.698346	810.852811	1603.671801	802.339539	1602.687786	801.847531	16
12	1142.459616	571.733446	1125.433071	563.220174	1124.449056	562.728166	E	1523.645586	762.326431	1506.619041	753.813159	1505.635026	753.321151	15
13	1257.486556	629.246916	1240.460011	620.733644	1239.475996	620.241636	D	1394.602996	697.805136	1377.576451	689.291864	1376.592436	688.799856	14
14	1344.518586	672.762931	1327.492041	664.249659	1326.508026	663.757651	S	1279.576056	640.291666	1262.549511	631.778394	1261.565496	631.286386	13
15	1431.550616	716.278946	1414.524071	707.765674	1413.540056	707.273666	S	1192.544026	596.775651	1175.517481	588.262379	1174.533466	587.770371	12
16	1528.603376	764.805326	1511.576831	756.292054	1510.592816	755.800046	P	1105.511996	553.259636	1088.485451	544.746364	1087.501436	544.254356	11
17	1625.656136	813.331706	1608.629591	804.818434	1607.645576	804.320426	P	1008.459236	504.733256	991.432691	496.219984	990.448676	495.727976	10
18	1696.693246	848.850261	1679.666701	840.336989	1678.682686	839.844981	A	911.406476	456.206876	894.379931	447.693604	893.395916	447.201596	9
19	1783.725276	892.366276	1766.698731	883.853004	1765.714716	883.360996	S	840.369366	420.688321	823.342821	412.175049	822.358806	411.683041	8
20	1870.757306	935.882291	1853.730761	927.360019	1852.746746	926.877011	S	753.337336	377.172306	736.310791	368.659034	735.326776	368.167026	7
21	1999.799896	1000.403586	1982.773351	991.890314	1981.789336	991.398306	E	666.305306	333.656291	649.278761	325.143019	648.294746	324.651011	6
22	2086.831926	1043.919601	2069.805381	1035.406329	2068.821366	1034.914321	S	537.262716	269.134996	520.236171	260.621724	519.252156	260.129716	5
23	2173.863956	1087.435616	2156.837411	1078.922343	2155.853396	1078.430336	S	450.230686	225.618981	433.204141	217.105708	432.220126	216.613701	4
24	2260.895986	1130.951631	2243.869441	1122.438358	2242.885426	1121.946351	S	363.198656	182.102966	346.172111	173.589694	345.188096	173.097686	3
25	2361.943666	1181.475471	2344.917121	1172.962198	2343.933106	1172.470191	T	276.166626	138.586951	259.140081	130.073679	258.156066	129.581671	2
26							R	175.118946	88.063111	158.092401	79.549839			

Abb. 55 **A**: MS/MS Spektrum; **B**: Vergrößerter Bereich des MS/MS Spektrums; **C**: Tabelle der identifizierten b- und y-Ionen (rot) eines zweiten Peptids aus „ARF-BP1“ bzw. „UREB1“ (Tabelle und MS/MS Spektrum wurden der Ergebnisseite des Mascot Suchprogramms entnommen).



Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1418.652451

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Ions Score: 66 Expect: 5.6e-005

Matches (**Bold Red**): 13/134 fragment ions using 24 most intense peaks

B

Matches (Bold Red): 13/134 fragment ions using 24 most intense peaks

#	b	b ⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq	y	y ⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	88.039306	44.523291	70.028746	35.518011	S							15
2	189.086986	95.047131	171.076426	86.041851	T	1332.627726	666.817501	1315.601181	658.304229	1314.617166	657.812221	14
3	260.124096	130.565686	242.113536	121.560406	A	1231.580046	616.293661	1214.553501	607.780389	1213.569486	607.288381	13
4	375.151036	188.079156	357.140476	179.073876	D	1160.542936	580.775106	1143.516391	572.261834	1142.532376	571.769826	12
5	462.183066	231.595171	444.172506	222.589891	S	1045.515996	523.261636	1028.489451	514.748364	1027.505436	514.256356	11
6	519.204526	260.105901	501.193966	251.100621	G	958.483966	479.745621	941.457421	471.232349	940.473406	470.740341	10
7	576.225986	288.616631	558.215426	279.611351	G	901.462506	451.234891	884.435961	442.721619	883.451946	442.229611	9
8	705.268576	353.137926	687.258016	344.132646	E	844.441046	422.724161	827.414501	414.210889	826.430486	413.718881	8
9	762.290036	381.648656	744.279476	372.643376	G	715.398456	358.202866	698.371911	349.689594	697.387896	349.197586	7
10	875.374096	438.190686	857.363536	429.185406	L	658.376996	329.692136	641.350451	321.178864	640.366436	320.686856	6
11	1004.416686	502.711981	986.406126	493.706701	E	545.292936	273.150106	528.266391	264.636833	527.282376	264.144826	5
12	1105.464366	553.235821	1087.453806	544.230541	T	416.250346	208.628811	399.223801	200.115538	398.239786	199.623531	4
13	1176.501476	588.754376	1158.490916	579.749096	A	315.202666	158.104971	298.176121	149.591698			3
14	1273.554236	637.280756	1255.543676	628.275476	P	244.165556	122.586416	227.139011	114.073143			2
15					K	147.112796	74.060036	130.086251	65.546763			1

Abb. 56 **A**: MS/MS Spektrum; **B**: Tabelle der identifizierten b- und y-Ionen (rot) eines Peptids das 3 unterschiedlichen Proteinen zugeordnet wurde: „hypothetisches Protein“, „FAM44A“ und „family with sequence similarity 44 member A“ (Tabelle und MS/MS Spektrum wurden der Ergebnissseite des Mascot Suchprogramms entnommen).

Protein	gi 56417899 : ARF-binding Protein		gi 22203742: „hypothetical protein“
1. Mass (Da)	485,539		55,196
2. Score	104		65
3. Queries matched	2		1
	Peptid 1	Peptid 2	Peptid 1
4. Observed	527.240200	845.975340	710.287590
5. Mr(expt)	1052.465848	2534.904192	1418.560628
6. Mr(calc)	1052.525040	2535.048035	1418.652451
7. Delta	-0.059192	-0.143843	-0.091823
8. Miss	0	0	0
9. Ion Score	55	49	65
10. Expect	0.00071	0.0017	5.6e-005
11. Rank	1	1	1
12. Peptide	K.ADGTATAPPPR.S	R.SDGSGESAPPE DSSPPASSESSSTR.D	K.STADSGGEGLETAPK.S
13. Proteins matching the same set of peptides	gi 57210077: Upstream regulatory element binding protein 1 (UREB1)		1) gi 41350830: FAM44A protein 2) gi 87299628: family with sequence similarity 44, member A
14. Mass (Da)	485,523		1) 36,466, 2) 332,433

Tab. 10: Zusammenfassung der Suchresultate nach Mascot (Datenbank: NCBI nr, Homo sapiens). 1. Molekulare Masse des identifizierten Proteins; 2. „total ion score“ (Erklärung siehe Text); 3. Anzahl der identifizierten Peptide; 4. Experimentell bestimmter m/z Wert; 5. Experimentell bestimmter m/z Wert umgerechnet in die relative molekulare Masse; 6. Theoretisch berechnete molekulare Masse; 7. Differenz zwischen experimentell bestimmter und berechneter molekularer Masse; 8. Anzahl an fehlenden Enzym-Spaltstellen; 9. „ion score“ (Erklärung s. Text); 10. „Erwartungswert“, gibt die Wahrscheinlichkeit an, einen gleichen oder höheren „ion score“ rein zufällig zu erhalten (Je kleiner dieser Wert ist, desto signifikanter ist das Ergebnis); 11. Rangliste der identifizierten Peptide (1-10, 1 = bester Rang); 12. Peptidsequenz im Ein-Buchstabencode; 13. Homologe Proteine; 14. Molekulare Masse der homologen Proteine.

6. Zusammenfassung und Diskussion der Ergebnisse

Mit der neu synthetisierten Verbindung Bisamid-bisplatin(II) (ESS46) war nach mehreren Optimierungsversuchen die Reproduktion der Protein-DNA-Quervernetzung im SDS-Polyacrylamidgel möglich. Der Versuch der Isolierung und Anreicherung der Spezies über eine isopyknische Ultrazentrifugation scheiterte, da der Komplex unter den gewählten Bedingungen scheinbar nicht ausreichend stabil war. Erst die direkte Isolierung von 30 Banden aus dem SDS-Polyacrylamidgel, die die Protein-DNA-Spezies enthielten, mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse des quervernetzten Proteins, konnte erste Ergebnisse liefern.

Die manuelle Auswertung der massenspektrometrischen Analyse (Anzahl und Intensität der identifizierten y- und b-Ionen) zeigte, dass 3 Peptide mit sehr hohen „ion scores“ identifiziert werden konnten. Dieses Ergebnis spricht für eine hohe Zuverlässigkeit der Identifizierung. Zwei identifizierte Peptide konnten dem „ARF-Binding Protein 1“ bzw. „UREB1“, und ein Peptid drei verschiedenen Proteinen zugeordnet werden: einem hypothetischen Protein, dem „FAM44A“-Protein und dem Protein „Family with sequence similarity 44 member A“.

Zwei der identifizierten Proteine „ARF-BP1“ und „Family with sequence similarity 44 member A“ weisen sehr hohe Molekulargewichte auf, so dass es sich lediglich um Hintergrundproteine handeln könnte, die bei der Isolierung der Protein-DNA-Banden mit aufgereinigt wurden. Zwar konnte keines der identifizierten Peptide in der Messung der Hintergrund-Proteine identifiziert werden, aber weitere Messungen müssen dies bestätigen, um eine abschließende Aussage treffen zu können. Die kleineren Molekulargewichte des hypothetischen und des „FAM44A“-Proteins würde diese als quervernetzte Proteine im Vergleich zu ARF-BP1 zwar zu wahrscheinlicheren Kandidaten als Letztere machen, ihre Identifizierung ist aber weniger zuverlässig wegen des geringeren „total ion score“ und der Identifizierung von nur einem Peptid der Proteine.

Da eine Wiederholungsmessung der Protein-DNA-QV und des Protein-Hintergrunds nicht möglich war, kann nach Abschluss dieser Arbeit noch keine endgültige Aussage über das quervernetzte Protein gemacht werden. Trotz der noch fehlenden Sicherheit der vorliegenden Daten, soll kurz auf die in Tabelle 9 aufgelisteten Proteine eingegangen werden: Obwohl die Proteine ARF-BP1 („alternate reading frame binding protein 1“) und UREB1 („upstream regulatory element binding protein 1“) in

der Datenbank als zwei getrennte, homologe Proteine angegeben werden, handelt es sich nach den neuesten Daten um Synonyme für das gleiche Protein. Weitere Bezeichnungen sind: Mule, E3^{Histone}, LASUI und HectH9 [176].

UREB1 aus der Ratte wurde schon früher auch als DNA-Bindendes Protein beschrieben [177]. Das humane Protein ARF-BP1 besteht aus einer HECT-Domäne („homolog zu E6-AP C-Terminus“; E6-AP = humanes Papilloma Virus E6 assoziiertes Protein), einer Ubiquitin-assoziierten Domäne und einer WWE-Domäne (für Tryptophan, Tryptophan, Glutamat) [176].

Das ARF-BP1 wird als neue E3-Ubiquitin-Ligase beschrieben, von der erst kürzlich eine Interaktion mit den Tumorsuppressorproteinen ARF und p53 [178], als auch mit dem antiapoptotischen Mcl-1 Protein, welches zu der bcl-2 Familie gehört, nachgewiesen wurde [179]. Auch eine Wechselwirkung mit dem Onkoprotein Myc konnte gezeigt werden [180]. Im Folgenden soll kurz auf die Zusammenhänge der bis jetzt gefundenen Funktionsweisen von ARF-BP1 eingegangen werden.

Mdm2, welches ein negativer Regulator von p53 ist, kann durch den Tumorsuppressor ARF gebunden werden. Dadurch wird p53 stabilisiert, was zum Zellzyklusarrest und gegebenenfalls danach zur Apoptose führen kann. Es konnte gezeigt werden, dass ARF-BP1 ARF binden kann. Mdm2 bleibt folglich unbeeinflusst, so dass die p53-abhängigen Prozesse gehemmt werden. Von den gleichen Autoren wurde auch eine direkte Inaktivierung von p53 durch ARF-BP1 über Ubiquitinierung beobachtet [178]. Das antiapoptotische Protein Mcl-1 kann ebenso von ARF-BP ubiquitiniert und dadurch abgebaut werden. Die Konsequenz davon ist allerdings ein apoptotischer Effekt. Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass die Eliminierung von Mcl-1 wichtig für die durch DNA-Schäden eingeleitete Apoptose ist [179].

Diese Daten zeigten, dass ARF-BP1 im Prinzip zwei gegenläufige Prozesse beeinflussen kann. Wie diese beiden Prozesse genau zusammenhängen, ist momentan aber noch nicht geklärt.

ARF-BP1 kann auch das Onkoprotein Myc ubiquitinieren, was aber nicht zu dessen Abbau führt. Allerdings werden dadurch die Transkriptionseffekte von Myc verändert. Es wurde gezeigt, dass eine Abreicherung von ARF-BP eine Herunterregulierung der Myc-abhängigen Genaktivierung bewirkte, und so die durch Myc induzierte Zellproliferation verhinderte [180]. Es wird angenommen, dass eine Induzierung des Tumorsuppressorproteins ARF durch Myc zu einer Inhibierung der ARF-BP1-Funktion führt („negativer Feedback loop“). Damit würde die durch Myc induzierte

Zellproliferation gehemmt werden. Auf der anderen Seite würde eine Überexpression von ARF-BP1, wie sie in primären Tumoren gefunden wurde, diese Regelung stören, so dass eine Unterbrechung dieses Systems einen Beitrag zur Tumorgenese haben könnte [176,180].

Wie die vorgestellten Daten zeigen, kann die Funktion von ARF-BP1 vielfältig sein, und gegenläufige Prozesse der Zelle beeinflusst werden. Was könnte ARF-BP1 als mögliches quervernetztes Protein für eine Funktion ausüben, bzw. was würde eine irreversible Bindung von ARF-BP1 an die durch Bisamid-bisplatin(II) hervorgerufene Läsion für die oben vorgestellten Mechanismen bedeuten?

Die erste Konsequenz einer Bindung an diese Läsion wäre, dass das Protein den physiologischen Prozessen der Zelle entzogen wird. Damit könnte z.B. p53 stabilisiert, und der p53-abhängige Zellzyklusarrest oder die Apoptose eingeleitet werden. Auf der anderen Seite könnte auch Mcl-1 nicht mehr durch ARF-BP1 abgebaut werden, was zu einer *Hemmung* der Apoptose führen würde. Im Hinblick auf das Onkoprotein Myc würde eine Abreicherung von ARF-BP1 eine Hemmung der Zellproliferation bedeuten.

Da die Bisamid-bisplatin(II) Verbindung und die anderen untersuchten Platinkomplexe, die die Quervernetzung eines Proteins zeigten, praktisch zytotoxisch inaktiv waren, könnte hier die normalerweise durch ARF-BP1 herbeigeführte Degradierung von Mcl-1 der relevante Prozess sein. Wenn ARF-BP1 nicht mehr zur Verfügung steht, da es kovalent über die Platinläsion verknüpft ist, kann Mcl-1 seine anti-apoptotischen Eigenschaften entfalten. Wie oben erwähnt, würde ein Nicht-Abbau von Mcl-1 die durch DNA-Schäden bedingte Apoptose hemmen, d.h. die DNA-Schädigung würde besser toleriert werden, die Zelle überlebt. Dies wäre in Übereinstimmung mit den gefundenen nicht zytotoxischen Eigenschaften der untersuchten Platinkomplexe. Natürlich kann eine Beeinflussung der anderen Systeme aber nicht ausgeschlossen werden.

Eine sehr interessante Untersuchung zeigte den Effekt einer Eliminierung (über RNA-Interferenz) von ARF-BP1 in Zellen, die anschließend mit DNA-Schädigenden Agenzien wie UV-Licht, Etoposid und auch Cisplatin behandelt wurden. Mit allen 3 Agenzien zeigte sich eine Abnahme der Apoptose im Vergleich zur Kontrolle; diese Abnahme war besonders bei mit Cisplatin behandelten Zellen ausgeprägt [179]. Diese Daten könnten ein Hinweis darauf sein, dass ARF-BP1 tatsächlich in irgendeiner Weise an der Prozessierung von DNA-Platinaddukten beteiligt sein

könnte. Eventuell könnte diese Untersuchung die oben vorgestellte Theorie bestärken, dass auch ein „Abfangen“ von ARF-BP1 durch bestimmte Platinverbindungen möglicherweise zu einer verminderten Apoptose führt. Diese Annahme ist aber rein spekulativ und kann erst nach sicherer Identifizierung des quervernetzten Proteins weiter untersucht werden.

Ein weiterer Punkt, der für ARF-BP1 als quervernetztes Protein sprechen würde, ist seine Überexpression in primären Tumorproben [180], sozusagen als kompensierende Gegenmaßnahme der Zelle. Wenn es sich tatsächlich um das gesuchte Protein handelt, könnte seine Quervernetzung an Platinläsionen auf der DNA einen weiteren Einblick in die Funktion von ARF-BP1 geben, z. B. über seine Beteiligung bei der Prozessierung von Platin-DNA-Addukten.

Bei dem zweiten identifizierten Protein handelt es sich um ein hypothetisches Protein, zu dem keine Hinweise auf die Funktion vorliegen. Das gleiche Peptid wurde zwei weiteren Proteinen zugeordnet, FAM44A und „Family with sequence similarity 44 member A“. Hier ist allerdings zu bemerken, dass die unterschiedlichen Molekulargewichte beider Proteine dafür sprechen, dass es sich bei „FAM44A“ lediglich um ein Spaltprodukt von „Family with sequence similarity 44 member A“ handelt. Auch diesen Proteinen konnte noch keine Funktion zugeordnet werden.

Wenn die Identifikation des Proteins in weiterführenden Arbeiten gelingen sollte, wäre dies (nach der ersten Option, s. Vorarbeiten) eine gute Möglichkeit die Prozessierung von Platin-DNA-Addukten zu studieren. Auch wenn das Protein nicht mit z.B. der DNA-Reparatur oder der Tumorgenese in Verbindung gebracht werden könnte, würde das Protein wertvolle Daten in Hinblick auf molekulare Erkennungsmechanismen liefern.

Die hier vorgestellte Theorie bedeutet aber nicht, dass alle Verbindungen, die Proteine quervernetzen können, zytotoxisch inaktiv sind. Wie im Abschnitt der *cis/trans*-Komplexe erwähnt, können auch zytotoxisch aktive Komplexe (z .B *trans*-EE), die genauso wie ESS46 vorwiegend monofunktionale Addukte mit der DNA bilden, Proteine binden. Allerdings wurde für diese Verbindung die Quervernetzung mit isolierten Proteinen studiert. In diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung der zytotoxisch aktiven *trans*-Verbindung KP1351, die Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit war, interessant, da auch dieser Komplex hauptsächlich monofunktionale Addukte mit der DNA bildet. In folgenden

Untersuchungen soll gezeigt werden, ob KP1351 das gleiche oder eben andere Proteine aus einem HeLa-Gesamtzellextrakt quervernetzen kann.

Zusammenfassung

Zu den wohl bekanntesten und erfolgreichsten Metallverbindungen in der Medizin gehört das Krebstherapeutikum Cisplatin. Sein Einsatz ist aber mit schweren und damit dosislimitierenden Nebenwirkungen und vielen weiteren Nachteilen, wie z.B. die Unzulänglichkeit bestimmter Organe belastet. Für eine effektivere und schonende Chemotherapie wurden seit den letzten 30 Jahren Tausende neuer Platinkomplexe synthetisiert. Viele dieser neuen Komplexe sollen durch ihre chemische Struktur neue Konzepte in der Therapie mit Metallkomplexen eröffnen. In dieser Arbeit wurden Metallverbindungen untersucht die fünf dieser neueren Konzepte repräsentierten.

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurden Platin- und Rutheniumkomplexe hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber DNA und in ihrer Eigenschaft, die DNA-Sekundärstruktur zu beeinflussen, untersucht. Anhand der angewendeten Methodik konnten Aussagen über die Art der gebildeten DNA-Addukte gemacht werden. Für einige der untersuchten Verbindungen wurden die intermolekularen Quervernetzungen mit der DNA direkt nachgewiesen. Die Ergebnisse sollten dabei in Zusammenhang mit bereits bestehenden Daten wie z.B. der Zytotoxizität der Komplexe in Verbindung gebracht werden.

Eine **Erhöhung der Organspezifität** von Metallverbindungen soll zum einen Nebenwirkungen vermindern und zum zweiten Organe, die normalerweise für die in der Klinik angewandten Verbindungen wie Cisplatin und Oxaliplatin wenig zugänglich sind, behandelbar machen. In diesem Zusammenhang wurden Platin(II)-Biphosphonat-Komplexe untersucht, die eine Akkumulation am Knochen bei gleichzeitig guter Wirkung gegen ein Osteosarkom zeigen. Interessanterweise wies die Verbindungsklasse der Platin(II)-Biphosphonate aber eine geringe zytotoxische Aktivität in vitro auf. Für diese Substanzklasse wurde neben der bekannten Akkumulation am Knochen die Aktivierung der Verbindungen durch das im Knochen enthaltene Calcium postuliert. In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob Calcium einen Einfluss auf die Reaktivität dieser Verbindungen gegenüber DNA und der DNA-Addukt-Bildung hat. Mit den verwendeten Methoden konnte sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Calcium nur eine geringe Reaktivität der Komplexe gegenüber DNA, und eine geringe Ausbildung von DNA-Addukten festgestellt werden. Dieses Ergebnis könnte der Grund für die geringe Zytotoxizität in vitro sein.

Anhand der gewonnenen Daten ist die angenommene Aktivierung dieser Verbindungen in vivo durch Calcium eher unwahrscheinlich. Allerdings konnte eine ausgesprochen hohe Sequenzspezifität entdeckt werden, die sich deutlich von Cisplatin und zum Teil auch von Oxaliplatin unterschied. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben der Akkumulation der Platin(II)-Biphosphonate am Knochen die unterschiedliche und hohe Sequenzspezifität im Gegensatz zu Cisplatin mit ein Grund für die Wirksamkeit dieser Verbindungsklasse auf dieses Organ in vivo sein könnte.

Die **Aktivierung der *trans*-Geometrie** stellt ein Konzept zur Überwindung von Kreuzresistenzen gegenüber Cisplatin dar. Mit der zytotoxisch aktiven *trans*-Acetoximverbindung (KP1351) und seinem inaktiven *cis*-Isomer (KP1352) ist zum ersten Mal eine Umkehrung der klassischen Struktur-Aktivitätsbeziehung gelungen (*trans* zytotoxisch aktiver als *cis*). Diese Umkehrung bestätigte sich auch bei der Untersuchung der DNA-Sekundärstrukturveränderungen und der Reaktivität gegenüber DNA beim Vergleich mit den parentalen Verbindungen Cis- und Transplatin: Das *cis*-Derivat konnte schneller mit DNA reagieren und Strukturveränderungen schneller induzieren. Das *trans*-Derivat KP1351 hingegen zeigte eine geringere Reaktivität gegenüber DNA und weniger ausgeprägte DNA-Strukturveränderungen. KP1351 (*trans*) konnte dabei vermutlich vor allem monofunktionale Addukte mit DNA bilden. Aus diesem Grund könnten diese auch einen wesentlichen Beitrag zur Ausbildung der ausgeprägten Zytotoxizität dieser Verbindung leisten. Als Vertreter der klassischen Struktur-Aktivitätsbeziehung (*cis* zytotoxisch aktiver als *trans*) wurden die *cis*- und *trans*-Hydroxylaminkomplexe (KP1556 und KP1555) untersucht. Im Gegensatz zu den parentalen Verbindungen (Cisplatin und Transplatin) reagierten diese aber schneller mit DNA, und das *cis*-Derivat war reaktiver gegenüber DNA als das *trans*-Derivat. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Effizienz einer Verbindung mit DNA zu reagieren, nicht unbedingt mit ihrer zytotoxischen Eigenschaft korreliert. Das bedeutet, dass es für die Zytotoxizität eine größere Rolle spielt, welche Arten von Addukten auf der DNA entstehen, welche Strukturveränderungen induziert werden und wie die entstandenen DNA-Addukte weiter prozessiert werden.

Platin(II)-Ringschluss-Komplexe sollen aufgrund ihrer chemischen Struktur vorwiegend im leicht sauren Milieu des Tumorgewebes wirken, dafür keine Aktivität in normalem Gewebe bei physiologischen pH-Wert entfalten („**prodrug**“ Prinzip). In

dieser Arbeit wurde die pH-abhängige Adduktbildung und die Reaktivität gegenüber DNA von zwei Ringschlusskomplexen, KP1433 und KP1356, untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einem pH-Wert von 7,4 keine oder nur eine geringe Adduktbildung und Reaktivität gegenüber DNA zu detektieren war. Im Gegensatz dazu zeigten beide Verbindungen bei pH 6,0 eine um den Faktor 10 beschleunigte Ausbildung von mono- und bifunktionalen Addukten als auch von intermolekularen Quervernetzungen mit der DNA, was von einer signifikanten Erhöhung der Reaktivität begleitet war. Dies spricht dafür, dass die bekannte, um den Faktor drei erhöhte in vitro Zytotoxizität der Komplexe bei Verwendung eines Kulturmediums mit leicht saurem pH-Wert alleine auf der erhöhten Adduktbildung mit der DNA beruhen könnte. Für beide Komplexe war aber die Ausbildung von bifunktionalen Addukten mit der DNA im Vergleich zu Cisplatin beeinträchtigt. Dies ist auf die chemische Struktur der Komplexe zurückzuführen, da bei den gewählten Bedingungen (pH 6,0) die Reaktion der zweiten reaktiven Platinvalenz mit der DNA behindert zu sein scheint. In diesem Zusammenhang konnte das erste Mal eine pH-abhängige Ausbildung von intermolekularen DNA-Quervernetzungen der parentalen Verbindung Cisplatin gezeigt werden, was zum besseren Verständnis der Prozessierung von Cisplatin-Addukten beitragen könnte.

Mit **alternativen Metallkomplexen** sollen Nebenwirkungen und Resistenzen vermieden, sowie das Einsatzspektrum von Metallverbindungen in der Krebstherapie erweitert werden. Mit dem hier untersuchten Ruthenium-Komplex KP1019 konnte eine Verbindung geschaffen werden, die eine hervorragende antitumorale Aktivität aufweist und sich bereits im Übergang zur klinischen Phase II befindet. Für die sehr gute in vivo Aktivität von Rutheniumkomplexen wird eine Reduktion des zentralen Rutheniumatoms im reduzierenden Milieu des Tumors in seine aktive Ru(II)-Form verantwortlich gemacht („Aktivierung-durch-Reduktion“ Hypothese). Diese Verbindungsklasse repräsentiert somit auch das „**prodrug**“ **Prinzip**. In dieser Arbeit wurden zwei Ruthenium-Komplexe, KP1019 und KP418, hinsichtlich ihrer DNA-Adduktbildung unter reduzierenden Bedingungen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass für KP1019 unter dem Einfluss von Ascorbinsäure tatsächlich eine schnellere Ausbildung von DNA-Addukten erfolgte. In Gegenwart von Glutathion aber wurde eine allgemein geringere Effizienz in der Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturveränderungen beobachtet. Allerdings konnte in Anwesenheit eines jeden Reduktionsmittels die Ausbildung von bifunktionalen Addukten mit der DNA

beschleunigt werden. Dies könnte bedeuten, dass unter reduzierenden Bedingungen nicht die schnellere Reaktion mit DNA, sondern eine andere Art der DNA-Wechselwirkung im Vordergrund steht, und diese zur antitumoralen Wirkung von KP1019 beitragen könnte. Die Reaktivität des Imidazolderivats KP418 wurde durch Ascorbinsäure nicht beeinflusst, und in Anwesenheit von GSH wurde die Reaktion mit DNA drastisch verringert. Dieser abweichende Reaktionsmechanismus im Vergleich zu KP1019 könnte mit ein Grund für die weniger ausgeprägten antitumoralen Eigenschaften von KP418 sein.

Der zweite Abschnitt der Arbeit befasste sich mit der **binuklearen Verbindung** Bisamid-bisplatin(II) (ESS46). Die Absicht der Synthese von polynuklearen Komplexen lag in der Vermutung, dass diese durch eine vermehrte Ausbildung von intermolekularen Quervernetzungen eine erhöhte Zytotoxizität haben könnten. ESS46 konnte zwar im Vergleich zu Cisplatin ein Vielfaches an intermolekularen Quervernetzungen ausbilden, war aber zytotoxisch inaktiv. Allerdings konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass eine mit diesem Komplex modifizierte DNA ein Protein aus einem HeLa-Gesamtzellextrakt kovalent quervernetzen kann. Nach erfolgreicher Neu-Synthese der Verbindung und Optimierung der Quervernetzungsbedingungen erfolgten durch Elution aus dem Gel die Isolierung der Protein-DNA-Spezies und nachfolgend die massenspektrometrische Analyse des quervernetzten Proteins. Die bis jetzt vorläufigen Ergebnisse zeigten, dass das ARF-BP1 („Alternate Reading Frame-Binding Protein 1“) ein möglicher Kandidat für das quervernetzte Protein sein könnte. Weiterführende Arbeiten müssen dies aber bestätigen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen, die molekularen Ursachen besser zu verstehen, die den biologischen Wirkmechanismen der oben aufgeführten neuen Verbindungen zu Grunde liegen.

Abkürzungen und chemische Bezeichnungen der Metallkomplexe

AA/Bis	Acrylamid/Bisacrylamid
ACN	Acetonitril
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Abb.	Abbildung
bcl-2	B-Zellen-Lymphom 2
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinder Serum Albumin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	dopplesträngig
DTT	Dithiothreitol
5- FU	5-Fluorouracil
GSH	Glutathion
h	Stunde(n)
HeLa	Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Henrietta Lacks)
HMG	High Mobility Group
IC ₅₀	50% Hemmkonzentration
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass-Spectrometry
Mcl-1	Myeloid cell leukaemia sequence 1
Mdm2	Murine double minute 2
M.-G.	Maxam-Gilbert
MMR	Mismatch Repair (Fehlpaarungsreparatur)
NER	Nucleotide Excision Repair (Nukleotid-Exzisions Reparatur)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
PAA	Polyacrylamid
QV	Quervernetzung
RT	Raumtemperatur

SDS	Sodium-dodecylsulfat (Natrium-dodecylsulfat)
ss	einzelsträngig
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-1-,2-diaminomethan
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
ÜN	über Nacht
V	Volt
Cisplatin	<i>cis</i> -Diammindichloroplatin(II)
Carboplatin	<i>cis</i> -Diammin-(1,1-cyclobutandicarboxylato)platinum(II)
Nedaplatin	<i>cis</i> -Diamminglycolatoplatinum(II)
Satraplatin	bis(aceto)amminedichloro(cyclohexylamin)-platinum(IV)
Transplatin	<i>trans</i> -Diammindichloroplatin(II)
Oxaliplatin	[(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i>)-cyclohexandiamin-N,N'] [oxalato(2-)-O,O']platinum(II)
trans-EE	<i>trans</i> -dichlorobis(<i>E</i> -iminoether)platinum(II)
KP1363	(<i>trans</i> -R,R-Cyclohexan-1,2-diamin) [(bis(phosphonomethyl)amino)aceto]platin(II)
KP1364	(<i>trans</i> -R,R-Cyclohexan-1,2-diamin) [(bis(phosphonomethyl)amino)methylphosphonato]platin(II)
KP1370	(<i>trans</i> -S,S-Cyclohexan-1,2-diamin) [(bis(phosphonomethyl)amino)aceto]platin(II)
KP1371	(<i>trans</i> -S,S-Cyclohexan-1,2-diamin) [(bis(phosphonomethyl)amino)methylphosphonato]platin(II)
KP735	Diammin[(bis(phosphonomethyl)amino)aceto]platin(II)
KP1351	<i>trans</i> -[bis(acetoxim)dichloroplatinum(II)]
KP1352	<i>cis</i> -[bis(acetoxim)dichloroplatinum(II)]

KP1555	<i>trans</i> -[bis(hydroxylamin)dichloroplatinum(II)]
KP1556	<i>cis</i> -[bis(hydroxylamin)dichloroplatinum(II)]
KP1356	(<i>SP</i> -4-2)-bis(2-aminoethanol)dichloroplatinum(II)
KP1433	(<i>SP</i> -4-2)-bis[(<i>R</i>)-(-)-2-aminobutanol]dichloroplatinum(II)
KP1019	Indazolium- <i>trans</i> -[tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III)]
KP418	Imidazolium- <i>trans</i> -[tetrachlorobis(1H-imidazol)ruthenat(III)]
ESS46	<i>cis</i> -Adipinsäure-bis[(1,2-diaminobut-4-yl)amid]dichloroplatinum(II)

Literaturverzeichnis

1. <http://www3.who.int/whosis/mort/>:
2. <http://www.fda.gov/CDER/drug/infopage/gleevec/default.htm>:
3. http://www.fda.gov/cder/previous_news2006.htm:
4. www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html:
5. Peyrone M: Über die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorid. *Annalen der Chemie und Pharmacie* 1844;LI:1-29.
6. Rosenberg B, van Camp L, Trosko JE, Mansour VH: Platinum compounds: a new class of potent antitumor agents. *Nature* 1969;222:385–386.
7. Hill JM, Speer RJ: Organo-platinum complexes as antitumor agents. *Anticancer Res* 1982;2:173-186.
8. Oliver T, Mead G: Testicular cancer. *Curr Opin Oncol* 1993;5:559-567.
9. Stathopoulos GP, Rigatos S, Malamos NA: Paclitaxel combined with cisplatin as second-line treatment in patients with advanced non-small cell lung cancers refractory to cisplatin. *Oncol Rep* 1999;6:797-800.
10. Weiss RB, Christian MC: New cisplatin analogues in development. A review. *Drugs* 1993;46:360-377.
11. Wong E, Giandomenico CM: Current status of platinum-based antitumor drugs. *Chem Rev* 1999;99:2451-2466.
12. de Mulder PH: The chemotherapy of head and neck cancer. *Anticancer Drugs* 1999;10 Suppl 1:S33-37.
13. Decatris MP, Sundar S, O'Byrne KJ: Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treat Rev* 2004;30:53-81.
14. Shelley MD, Burgon K, Mason MD: Treatment of testicular germ-cell cancer: a cochrane evidence-based systematic review. *Cancer Treat Rev* 2002;28:237-253.
15. Bosl GJ, Bajorin DF, Sheinfeld J: in DeVita VTJ, Hellmann, S. & Rosenberg, S.A. (ed): *Cancer of the Testis*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
16. Hromas RA, North JA, Burns CP: Decreased cisplatin uptake by resistant L1210 leukemia cells. *Cancer Lett* 1987;36:197-201.
17. Mann SC, Andrews PA, Howell SB: Modulation of cis-diamminedichloroplatinum(II) accumulation and sensitivity by forskolin and 3-isobutyl-1-methylxanthine in sensitive and resistant human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 1991;48:866-872.
18. Binks SP, Dobrota M: Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine. *Biochem Pharmacol* 1990;40:1329-1336.
19. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I: Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14298-14302.
20. Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R, Howell SB: The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004;66:817-823.
21. Lepre CA, Lippard SJ: Interaction of platinum antitumor compounds with DNA. in Eckstein F, Lilley DMJ (eds): *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1990, vol 4, 9-38.
22. Jamieson ER, Lippard SJ: Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 1999;99:2467-2498.
23. Johnson NP, Hoeschele JD, Rahn RO: Kinetic analysis of the in vitro binding of radioactive cis- and trans-dichlorodiammineplatinum(II) to DNA. *Chem Biol Interact* 1980;30:151-169.
24. Fichtinger-Schepman AM, van der Veer JL, den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J: Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 1985;24:707-713.
25. Eastman A: The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. *Pharmacol Ther* 1987;34:155-166.
26. Pullman A, Pullman B: Molecular electrostatic potential of the nucleic acids. *Q Rev Biophys* 1981;14:289-380.
27. Laoui A, Kozelka J, Chottard JC: Cis-Diamminediaquaplatinum(II); Selectivity for GpG: Influence of the Adjacent Base of the First Platination Step. *Inorg Chem* 1988;27:2751-2753.
28. Sip M, Leng M: DNA, cis-Platinum and Intercalators: Catalytic Activity of the DNA Double Helix in Eckstein F, Lilley DMJ (eds): *Nucleic Acids and Molecular Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag, 1993, vol 7, 1-15.

29. Kartalou M, Essigmann JM: Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* 2001;478:1-21.
30. Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ: Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature* 1995;377:649-652.
31. Yang D, van BS, Reedijk J, van BJ, Wang AH: Structure and isomerization of an intrastrand cisplatin-cross-linked octamer DNA duplex by NMR analysis. *Biochemistry* 1995;34:12912-12920.
32. Paquet F, Boudvillain M, Lancelot G, Leng M: NMR solution structure of a DNA dodecamer containing a transplatin interstrand GN7-CN3 cross-link. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4261-4268.
33. Malinge JM, Giraud-Panis MJ, Leng M: Interstrand cross-links of cisplatin induce striking distortions in DNA. *J Inorg Biochem* 1999;77:23-29.
34. Coste F, Malinge JM, Serre L, Shepard W, Roth M, Leng M, Zelwer C: Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site. *Nucleic Acids Res* 1999;27:1837-1846.
35. Paquet F, Perez C, Leng M, Lancelot G, Malinge J-M: NMR solution structure of a DNA decamer containing an interstrand cross-link of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II). *J Biomol Struct Dyn* 1996;14:67-77.
36. Huang H, Zhu L, Reid BR, Drobny GP, Hopkins PB: Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link. *Science* 1995;270:1842-1845.
37. Gelasco A, Lippard SJ: DNA Interactions. in Clarke MJ, Sadler, P.J. (ed): *Metallopharmaceuticals*. Berlin: Springer, 1999, 1.
38. Teuben JM, Bauer C, Wang AH, Reedijk J: Solution structure of a DNA duplex containing a cis-diammineplatinum(II) 1,3-d(GTG) intrastrand cross-link, a major adduct in cells treated with the anticancer drug carboplatin. *Biochemistry* 1999;38:12305-12312.
39. van Garderen CJ, van Houte LP: The solution structure of a DNA duplex containing the cis-Pt(NH₃)₂[d(-GTG)-N7(G),N7(G)] adduct, as determined with high-field NMR and molecular mechanics/dynamics. *Eur J Biochem* 1994;225:1169-1179.
40. Bellon SF, Lippard SJ: Bending studies of DNA site-specifically modified by cisplatin, *trans*-diamminedichloroplatinum(II) and *cis*-[Pt(NH₃)₂(N3-cytosine)Cl]⁺. *Biophys Chem* 1990;35:179-188.
41. Takahara PM, Frederick CA, Lippard SJ: Crystal structure of the anticancer drug cisplatin bound to duplex DNA. *Journal of the American Chemical Society* 1996;118:12309-12321.
42. Gelasco A, Lippard SJ: NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Biochemistry* 1998;37:9230-9239.
43. Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ: DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 1991;30:8026-8035.
44. Fouchet MH, Guittet E, Cognet JAH, Kozelka J, Gauthier C, M. LB, Zimmermann K, Chottard JC: Structure of a nonanucleotide duplex cross-linked by cisplatin at an ApG sequence. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 1997;2:83-92.
45. Malinge J-M, Pérez C, Leng M: Base sequence-independent distortions induced by interstrand cross-links in *cis*-diamminedichloroplatinum (II)-modified DNA. *Nucleic Acids Res* 1994;22:3834-3839.
46. Sorenson CM, Eastman A: Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1988;48:6703-6707.
47. Huang JC, Zamble DB, Reardon JT, Lippard SJ, Sancar A: HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:10394-10398.
48. Zamble DB, Mu D, Reardon JT, Sancar A, Lippard SJ: Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease. *Biochemistry* 1996;35:10004-10013.
49. He Q, Liang CH, Lippard SJ: Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:5768-5772.
50. Nagatani G, Nomoto M, Takano H, Ise T, Kato K, Imamura T, Izumi H, Makishima K, Kohno K: Transcriptional activation of the human HMG1 gene in cisplatin-resistant human cancer cells. *Cancer Res* 2001;61:1592-1597.
51. Jordan P, Carmo-Fonseca M: Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:1229-1235.

52. Aebi S, Fink D, Gordon R, Kim HK, Zheng H, Fink JL, Howell SB: Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells. *Clin Cancer Res* 1997;3:1763-1767.
53. Fink D, Nebel S, Aebi S, Zheng H, Cenni B, Nehme A, Christen RD, Howell SB: The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res* 1996;56:4881-4886.
54. Bellacosa A: Functional interactions and signaling properties of mammalian DNA mismatch repair proteins. *Cell Death Differ* 2001;8:1076-1092.
55. Moggs JG, Szymkowski DE, Yamada M, Karran P, Wood RD: Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts. *Nucleic Acids Res* 1997;25:480-491.
56. Mo Y, Gan Y, Song S, Johnston J, Xiao X, Wientjes MG, Au JL: Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach. *Cancer Res* 2003;63:579-585.
57. Masutomi K, Hahn WC: Telomerase and tumorigenesis. *Cancer Lett* 2003;194:163-172.
58. Burger AM, Double JA, Newell DR: Inhibition of telomerase activity by cisplatin in human testicular cancer cells. *Eur J Cancer* 1997;33:638-644.
59. Mese H, Ueyama Y, Suzuki A, Nakayama S, Sasaki A, Hamakawa H, Matsumura T: Inhibition of telomerase activity as a measure of tumor cell killing by cisplatin in squamous cell carcinoma cell line. *Chemotherapy* 2001;47:136-142.
60. Furuta M, Nozawa K, Takemura M, Izuta S, Murate T, Tsuchiya M, Yoshida K, Taka N, Nimura Y, Yoshida S: A novel platinum compound inhibits telomerase activity in vitro and reduces telomere length in a human hepatoma cell line. *International Journal of Cancer* 2003;104:709-715.
61. van Waardenburg RC, de Jong LA, van Eijndhoven MA, Verseyden C, Pluim D, Jansen LE, Bjornsti MA, Schellens JH: Platinated DNA adducts enhance poisoning of DNA topoisomerase I by camptothecin. *J Biol Chem* 2004;279:54502-54509.
62. Jensen R, Glazer PM: Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6134-6139.
63. Wang D, Lippard SJ: Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:307-320.
64. Shaul Y: c-Abl: activation and nuclear targets. *Cell Death Differ* 2000;7:10-16.
65. Theis S, Roemer K: c-Abl tyrosine kinase can mediate tumor cell apoptosis independently of the Rb and p53 tumor suppressors. *Oncogene* 1998;17:557-564.
66. Cong F, Goff SP: c-Abl-induced apoptosis, but not cell cycle arrest, requires mitogen-activated protein kinase kinase 6 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:13819-13824.
67. Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG, Jr., Levrero M, Wang JY: The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. *Nature* 1999;399:806-809.
68. Kharbanda S, Ren R, Pandey P, Shafman TD, Feller SM, Weichselbaum RR, Kufe DW: Activation of the c-Abl tyrosine kinase in the stress response to DNA-damaging agents. *Nature* 1995;376:785-788.
69. Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D: Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene* 1998;17:3309-3318.
70. Sanchez-Prieto R, Sanchez-Arevalo VJ, Servitja JM, Gutkind JS: Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway. *Oncogene* 2002;21:974-979.
71. Miao YJ, Wang JY: Binding of A/T-rich DNA by three high mobility group-like domains in c-Abl tyrosine kinase. *J Biol Chem* 1996;271:22823-22830.
72. David-Cordonnier MH, Payet D, D'Halluin JC, Waring MJ, Travers AA, Bailly C: The DNA-binding domain of human c-Abl tyrosine kinase promotes the interaction of a HMG chromosomal protein with DNA. *Nucleic Acids Res* 1999;27:2265-2270.
73. Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'Incalci M, Broggin M: Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation. *Neoplasia* 2001;3:10-16.
74. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM: Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Mol Pharmacol* 2001;59:657-663.
75. Herceg Z, Wang ZQ: Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* 2001;477:97-110.
76. Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003;22:7265-7279.
77. Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB: The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Pharmacol* 2002;62:1154-1159.
78. Baekelandt MM, Holm R, Nesland JM, Trope CG, Kristensen GB: P-glycoprotein expression is a marker for chemotherapy resistance and prognosis in advanced ovarian cancer. *Anticancer Res* 2000;20:1061-1067.

79. Borst P, Evers R, Kool M, Wijnholds J: A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1295-1302.
80. Ishikawa T, Ali-Osman F: Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance. *J Biol Chem* 1993;268:20116-20125.
81. Behrens BC, Hamilton TC, Masuda H, Grotzinger KR, Whang-Peng J, Louie KG, Knutsen T, McKoy WM, Young RC, Ozols RF: Characterization of a cis-diamminedichloroplatinum(II)-resistant human ovarian cancer cell line and its use in evaluation of platinum analogues. *Cancer Res* 1987;47:414-418.
82. Pendyala L, Velagapudi S, Toth K, Zdanowicz J, Graves D, Slocum H, Perez R, Huben R, Creaven PJ, Raghavan D: Translational studies of glutathione in bladder cancer cell lines and human specimens. *Clin Cancer Res* 1997;3:793-798.
83. Kasahara K, Fujiwara Y, Nishio K, Ohmori T, Sugimoto Y, Komiya K, Matsuda T, Saijo N: Metallothionein content correlates with the sensitivity of human small cell lung cancer cell lines to cisplatin. *Cancer Res* 1991;51:3237-3242.
84. Ferry KV, Hamilton TC, Johnson SW: Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1305-1313.
85. Galanski M, Jakupec MA, Keppler BK: Update of the preclinical situation of anticancer platinum complexes: novel design strategies and innovative analytical approaches. *Curr Med Chem* 2005;12:2075-2094.
86. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, Parker R, Reed E, Paull K, Fojo T: Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol* 1996;52:1855-1865.
87. Tashiro T, Kawada Y, Sakurai Y, Kidani Y: Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-1,2-diaminocyclohexane)platinum (II): new experimental data. *Biomed Pharmacother* 1989;43:251-260.
88. Galanski M, Arion VB, Jakupec MA, Keppler BK: Recent Developments in the Field of Tumor-Inhibiting Metal Complexes. *Curr Pharm Des* 2003;9:2078-2089.
89. Cleare M, Hoeschele J: Platinum(II) complexes: Studies on the antitumor activity of group VIII transition metal complexes. Part I. *Bioinorg Chem* 1973;2:187-210.
90. Farrell N, Ha TT, Souchard JP, Wimmer FL, Cros S, Johnson NP: Cytostatic trans-platinum(II) complexes. *J Med Chem* 1989;32:2240-2241.
91. Brabec V, Kasparkova J, Vrana O, Novakova O, Cox JW, Qu Y, Farrell N: DNA modifications by a novel bifunctional trinuclear platinum phase I anticancer agent. *Biochemistry* 1999;38:6781-6790.
92. Heffeter P, Jakupec MA, Korner W, Wild S, von Keyserlingk NG, Elbling L, Zorbas H, Korynevskaya A, Knasmüller S, Sutterluty H, Micksche M, Keppler BK, Berger W: Anticancer activity of the lanthanum compound [tris(1,10-phenanthroline)lanthanum(III)]trithiocyanate (KP772; FFC24). *Biochem Pharmacol* 2006;71:426-440.
93. Abu-Surrah AS, Kettunen M: Platinum group antitumor chemistry: design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin. *Curr Med Chem* 2006;13:1337-1357.
94. Bates A, Maxwell A: DNA Topology. Oxford, Oxford University Press, 1993.
95. Voet D, Voet JG: Biochemie. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1992.
96. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM: Prinzipien der Biochemie. Berlin, Spektrum Akademischer Verlag, 1993.
97. Wingen F, Schmihl, D.: Distribution of 3-amino-1-hydroxypropane-1,1-diphosphonic acid in rats and effects on rat osteosarcoma. *Drug Research (Arzneimittel-Forschung)* 1985;35(10):1565-1571.
98. Klenner T, Wingen F, Keppler BK, Krempien B, Schmähl D: Anticancer-agent-linked phosphonates with antiosteolytic and antineoplastic properties: a promising perspective in the treatment of bone-related malignancies? *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:341-350.
99. Slaby S, Galanski M, Metzger SW, Keppler BK: Design of Platinum Complexes With High Affinity for Osteosarcoma and Bone Metastases. Structure-Activity Relationship. in Fiebig HH, Burger AM (eds): *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development. Contributions to Oncology*. Queisser, W., Scheithauer, W., 1999, vol 54, 201-205.
100. Galanski M, Slaby S, Jakupec MA, Keppler BK: Synthesis, characterization, and in vitro antitumor activity of osteotropic diam(m)ineplatinum(II) complexes bearing a N,N-bis(phosphonomethyl)glycine ligand. *J Med Chem* 2003;46:4946-4951.
101. Galanski M, Slaby S, M.A. J, B.K. K: Synthesis and in vitro antitumor potency of (cyclohexane-1,2-diamine)platinum(II) complexes with aminotris(methylenephosphonic acid) as bone-seeking ligands. Unpublished results.

102. Klenner T, Wingen F, Keppler B, Valenzuela-Paz P, Amelung F, Schmahl D: Therapeutic efficacy of two different cytostatic-linked phosphonates in combination with razoxane in the transplantable osteosarcoma of the rat. *Clin Exp Metastasis* 1990;8:345-359.
103. Klenner T, Wingen F, Keppler BK, Krempien B, Schmahl D: Anticancer-agent-linked phosphonates with antiosteolytic and antineoplastic properties: a promising perspective in the treatment of bone-related malignancies? *J Cancer Res Clin Oncol* 1990;116:341-350.
104. Klenner T, Valenzuela-Paz P, Amelung F, Muench H, Zahn H, Blum HI, Keppler BK: Platinum Phosphonato Complexes with Particular Activity Against Bone Malignancies. Evaluation of an Experimental Tumor Model Highly Predictive for the Clinical Situation. in *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo,, 1993, 85-127.
105. Galanski M, Slaby S, Keppler BK: The Mode of Action of Antitumor Platinum Compounds Linked to Amino Phosphonic Acids With Particular Activity Against Bone Malignancies and the Influence of Calcium Ions onto the DNA Binding Behavior. . in Fiebig HH, Burger AM (eds): *Relevance of Tumor Models for Anticancer Drug Development*. Contributions to Oncology. Queisser, W., Scheithauer, W., 1999, vol 54, 435-438.
106. Bloemink M, Diederens J, Dorenbos J, Heetebrij R, Keppler B, Reedijk J: Calcium ions do accelerate the DNA binding of new antitumor-active platinum aminophosphonate complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry* 1999;(10):1655-1657.
107. Einhauser TJ, Galanski M, Vogel E, Keppler BK: The influence of calcium ions on the DNA binding behaviour of a new platinum(II) compound linked to an amino phosphonic acid. *Inorganica Chimica Acta* 1997 257(2):265-268.
108. Bloemink M, Dorenbos J, Heetebrij R, Keppler B, Reedijk J, Zahn H: New Antitumor Platinum Compounds Linked to Amino Phosphonic Acids Which Lose the Phosphonate and Tertiary Amine Ligand upon Binding to Nucleic Acids. *Inorganic Chemistry* 1994;33:1127-1132.
109. Saris CP, van de Vaart PJ, Rietbroek RC, Blommaert FA: In vitro formation of DNA adducts by cisplatin, lobaplatin and oxaliplatin in calf thymus DNA in solution and in cultured human cells. *Carcinogenesis* 1996;17:2763-2769.
110. Woynarowski JM, Chapman WG, Napier C, Herzig MC, Juniewicz P: Sequence- and region-specificity of oxaliplatin adducts in naked and cellular DNA. *Mol Pharmacol* 1998;54:770-777.
111. Lippert B: Platinum nucleobase chemistry. in Lippard SJ (ed): *Prog. Inorg. Chem.: J. Wiley & Sons, Inc.*, 1989, vol 37, 1-97.
112. Sherman SE, Lippard SJ: Structural aspects of platinum anticancer drug interactions with DNA. *Chem. Rev.* 1987;87:1153-1181.
113. Büning H, Altman J, Beck W, Zorbas H: Molecular interaction of DNA with bisplatinum(II) complexes having bis(vicinal 1,2-diamines) as ligand. *Biochemistry* 1997;36:11408-11418.
114. Farrell N, Kelland LR, Roberts JD, van Beusichem M: Activation of the *trans* geometry in platinum antitumor complexes: a survey of the cytotoxicity of *trans* complexes containing planar ligands in murine L1210 and human tumor panels and studies on their mechanism of action. *Cancer Res* 1992;52:5065-5072.
115. Kelland LR, Barnard CF, Evans IG, Murrer BA, Theobald BR, Wyer SB, Goddard PM, Jones M, Valenti M, Bryant A, et al.: Synthesis and in vitro and in vivo antitumor activity of a series of *trans* platinum antitumor complexes. *J Med Chem* 1995;38:3016-3024.
116. Coluccia M, Nassi A, Boccarelli A, Giordano D, Cardellicchio N, Locker D, Leng M, Sivo M, Intini FP, Natile G: In vitro and in vivo antitumour activity and cellular pharmacological properties of new platinum-iminoether complexes with different configuration at the iminoether ligands. *J Inorg Biochem* 1999;77:31-35.
117. Perez JM, Kelland LR, Montero EI, Boxall FE, Fuertes MA, Alonso C, Navarro-Ranninger C: Antitumor and cellular pharmacological properties of a novel platinum(IV) complex: *trans*-[PtCl(2)(OH)(2)(dimethylamine) (isopropylamine)]. *Mol Pharmacol* 2003;63:933-944.
118. Najjreh Y, Khazanov E, Jawbry S, Ardali-Tzaraf Y, Perez JM, Kasparkova J, Brabec V, Barenholz Y, Gibson D: Cationic nonsymmetric transplatinum complexes with piperidinopiperidine ligands. Preparation, characterization, in vitro cytotoxicity, in vivo toxicity, and anticancer efficacy studies. *J Med Chem* 2006;49:4665-4673.
119. Farrell N: Current status of structure-activity relationships of platinum anticancer drugs: activation of the *trans* geometry. in Sigel A, Sigel H (eds): *Interactions of Metal Ions with Nucleotides, Nucleic Acids, and Their Constituents*. Metal Ions in Biological Systems. New York: M. Dekker, 1996, vol 32 603-639.
120. Coluccia M, Boccarelli A, Mariggio MA, Cardellicchio N, Caputo P, Intini FP, Natile G: Platinum(II) complexes containing iminoethers: a *trans* platinum antitumour agent. *Chem Biol Interact* 1995;98:251-266.
121. Kukushkin VY, Izotova YA, Tudela D: Platinum(II) complexes of propanone oxime. *Inorg. Synth.* 2004;34:81-85.

122. Zorbas-Seifried S, Jakupec M, Kukushkin N, Groessl M, Hartinger C, Semenova O, Zorbas H, Kukushkin VY, Keppler B: Reversion of structure-activity relationships of antitumor platinum complexes by acetoxime but not hydroxylamine ligands. Published online ahead of print on October 18, 2006 as doi:10.1124/mol.106.030726. Mol Pharmacol 2006.
123. Zaludova R, Zakovska A, Kasparkova J, Balcarova Z, Vrana O, Coluccia M, Natile G, Brabec V: DNA modifications by antitumor trans-[PtCl₂(E-iminoether)₂]. Mol Pharmacol 1997;52:354-361.
124. Kasparkova J, Novakova O, Farrell N, Brabec V: DNA binding by antitumor trans-[PtCl₂(NH₃)(thiazole)]. Protein recognition and nucleotide excision repair of monofunctional adducts. Biochemistry 2003;42:792-800.
125. Novakova O, Kasparkova J, Malina J, Natile G, Brabec V: DNA-protein cross-linking by trans-[PtCl₂(E-iminoether)₂]. A concept for activation of the trans geometry in platinum antitumor complexes. Nucleic Acids Res 2003;31:6450-6460.
126. Zakovska A, Novakova O, Balcarova Z, Bierbach U, Farrell N, Brabec V: DNA interactions of antitumor trans-[PtCl₂(NH₃)(quinoline)]. Eur J Biochem 1998;254:547-557.
127. Natile G, Coluccia M: Antitumor Active Trans-Platinum Compounds. in Sigel A, Sigel H (eds): Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents. Metal Ions in Biological Systems New York: M. Dekker, 2003, vol 42, 209-250.
128. Höckel M, Vaupel P: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. J Natl Cancer Inst 2001;93:266-276.
129. Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condrón CM, Toomey D: Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therapies. Cancer Treat Rev 2003;29:297-307.
130. Zimmermann W, Galanski M, Keppler BK, Giester G: Synthesis and structures of (SP-4-2)-diiodobis(2-hydroxyethylamine)platinum(II), (SP-4-2)-dichlorobis(2-hydroxyethylamine)platinum(II) and (OC-6-22)-bis(2-hydroxyethylamine)tetrachloroplatinum(IV) in the crystal. Inorg Chim Acta 1999;292:127-130.
131. Galanski M, Baumgartner M, Arion V, Keppler BK: Bis(2-aminobutanol)dichloroplatinum(II) Complexes and Their Singly and Doubly Ring-Closed Butanolato Species - Novel Prodrugs for Platinum-Based Antitumour Chemotherapy? Eur J Inorg Chem 2003:2619-2625.
132. Zorbas-Seifried S, Hartinger CG, Meelich K, Galanski M, Keppler BK, Zorbas H: DNA Interactions of pH-Sensitive, Antitumor Bis(aminoalcohol)dichloroplatinum(II) Complexes. Biochemistry 2006;45:14817-14825.
133. Galanski M, Baumgartner C, Meelich K, Arion VB, Fremuth M, Jakupec MA, Schluga P, Hartinger CG, Graf v. Keyserlingk N, Keppler BK: Synthesis, crystal structure and pH dependent cytotoxicity of (SP-4-2)-bis(2-aminoethanolato-k²N,O)platinum(II) – a representative of novel pH sensitive anticancer platinum complexes. Inorg Chim Acta 2004;357 3237-3244.
134. Robillard MS, Galanski M, Zimmermann W, Keppler BK, Reedijk J: (Aminoethanol)dichloroplatinum(II) complexes: influence of the hydroxyethyl moiety on 5'-GMP and DNA binding, intramolecular stability, the partition coefficient and anticancer activity. J Inorg Biochem 2002;88:254-259.
135. Kung A, Galanski M, Baumgartner C, Keppler BK: Reaction of (SP-4-2)-dichlorobis(2-hydroxyethylamine)platinum(II) with 5'-GMP under simulated physiological conditions, a CZE-ESI-MS study. Inorg Chim Acta 2002;339:9-13.
136. Hartinger CG, Schluga P, Galanski M, Baumgartner C, Timerbaev AR, Keppler BK: Tumor-inhibiting platinum(II) complexes with aminoalcohol ligands: comparison of the mode of action by capillary electrophoresis and electrospray ionization-mass spectrometry. Electrophoresis 2003;24:2038-2044.
137. Yuan J, Glazer PM: Mutagenesis induced by the tumor microenvironment. Mutat Res 1998; 400:439-446.
138. Yuan J, Narayanan L, Rockwell S, Glazer PM: Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. Cancer Res 2000;60:4372-4376.
139. Schmaltz C, Hardenbergh PH, Wells A, Fisher DE: Regulation of proliferation-survival decisions during tumor cell hypoxia Mol Cell Biol 1998;18:2845-2854.
140. Laurencot CM, Kennedy KA: Influence of pH on the cytotoxicity of cisplatin in EMT6 mouse mammary tumor cells. Oncol Res 1995;7:371-379.
141. Schwerdt G, Freuding R, Schuster C, Weber F, Thews O, Gekle M: Cisplatin-induced apoptosis is enhanced by hypoxia and by inhibition of mitochondria in renal collecting duct cells. Toxicol Sci 2005;85:735-742.

142. Miller SE, House DA: The Hydrolysis Products of cis-Diamminedichloroplatinum(II). I. The Kinetics of Formation and Anation of the cis-Diammine(aqua)chloroplatinum(II) Cation in Acidic Aqueous Solution. *Inorganica Chimica Acta* 1989;161:131-137.
143. Miller SE, House DA: The Hydrolysis Products of cis-Dichlorodiammineplatinum(II). 2. The Kinetics of Formation and Anation of the cis-Diamminedi(aqua)platinum(II) Cation. 1989;166:189-197.
144. Miller SE, House DA: The Hydrolysis Products of cis-Dichlorodiammineplatinum(II). 3. Hydrolysis Kinetics at Physiological pH. *Inorganica Chimica Acta* 1990;173:53-60.
145. Chau Q, Stewart DJ: Cisplatin efflux, binding and intracellular pH in the HTB56 human lung adenocarcinoma cell line and the E-8/0.7 cisplatin-resistant variant. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999;44:193-202.
146. Murakami T, Shibuya I, Ise T, Chen ZS, Akiyama S, Nakagawa M, Izumi H, Nakamura T, Matsuo K, Yamada Y, Kohno K: Elevated expression of vacuolar proton pump genes and cellular pH in cisplatin resistance. *Int J Cancer* 2001;93:869-874.
147. Huang Z, Huang Y: The change of intracellular pH is involved in the cisplatin-resistance of human lung adenocarcinoma A549/DDP cells. *Cancer Invest* 2005;23:26-32.
148. Jakupiec MA, Keppler BK: Gallium and other main group metal compounds as antitumor agents. in Sigel A, Sigel H (eds): *Metal Complexes in Tumor Diagnosis and as Anticancer Agents. Metal Ions in Biological Systems*. New York: M. Dekker, 2004, vol 42, 425-462.
149. Kostova I: Ruthenium complexes as anticancer agents. *Curr Med Chem* 2006;13:1085-1107.
150. Galanski M, Arion VB, Jakupiec MA, Keppler BK: Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr Pharm Des* 2003;9:2078-2089.
151. Dittrich C, Scheulen ME, Jaehde U, Kynast B, Gneist M, Richly H, Schaad S, Arion V, Keppler BK: Phase I and Pharmacokinetic Study of Sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)Ruthenate(III)]/Indazole-hydrochloride (1:1.1) (FFC14A, KP1019) in Patients with Solid Tumors- A Study of the CESAR Central European Society for Anticancer Drug Research - EWIV in: *Proceedings of the 96th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*, Anaheim, 46, 110, Abstr.Nr.472 2005.
152. Hartinger CG, Zorbas-Seifried S, Jakupiec MA, Kynast B, Zorbas H, Keppler BK: From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J Inorg Biochem* 2006;100:891-904.
153. Keppler BK, Henn M, Juhl UM, Berger MR, Nieble R, Wagner FE: New Ruthium complexes for the treatment of cancer *Prog. Clin. Biochem. Med.* 1989;10:41-69.
154. Malina J, Novakova O, Keppler BK, Alessio E, Brabec V: Biophysical analysis of natural, double-helical DNA modified by anticancer heterocyclic complexes of ruthenium(III) in cell-free media. *J Biol Inorg Chem* 2001;6:435-445.
155. Clarke MJ, Zhu F, Frasca DR: Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem Rev* 1999;99:2511-2534.
156. Clarke MJ: Ruthenium metallopharmaceuticals. *Coord. Chem. Rev.* 2003;236:209-233.
157. Reisner E, Arion VB, Guedes da Silva MF, Lichtenegger R, Eichinger A, Keppler BK, Kukushkin VY, Pombeiro AJ: Tuning of redox potentials for the design of ruthenium anticancer drugs -- an electrochemical study of [trans-RuCl(4)L(DMSO)](-) and [trans-RuCl(4)L(2)](-) complexes, where L = imidazole, 1,2,4-triazole, indazole. *Inorg Chem* 2004;43:7083-7093.
158. Schluga P, Hartinger CG, Egger A, Reisner E, Galanski M, Jakupiec MA, Keppler BK: Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Trans* 2006:1796-1802.
159. Ruiz JJ, Aldaz A, Dominguez M: Mechanism of L-ascorbic acid oxidation and dehydro-L-ascorbic acid reduction on a mercury electrode. I. Acid medium. *Can. J. Chem.* 1977;55:2799-2806.
160. Meister A: Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem* 1988;263:17205-17208.
161. Frasca DR, Clarke MJ: Alterations in the binding of [Cl(NH3)(5)Ru-III] to DNA by glutathione: Reduction, autoxidation, coordination, and decomposition. *Journal of the American Chemical Society* 1999 121:8523-8532.
162. Eastman A: Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes. *Chem Biol Interact* 1987;61:241-248.
163. Eastman A, Barry MA: Interaction of trans-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation of monofunctional adducts and their reaction with glutathione. *Biochemistry* 1987;26:3303-3307.

164. Bose RN, Moghaddas S, Weaver E, Cox EW: Reactivity of glutathione and cysteine toward platinum(II) in the presence and absence of guanosine-5'-monophosphate. *Inorg. Chem.* 1995;34:5878-5883.
165. Feeney MM, Kelly JM, Tossi AB, Kirsch-de Mesmaeker A, Lecomte J-P: Photoaddition of ruthenium(II)-tris-1,4,5&tetraazaphenanthrene to DNA and mononucleotides. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1994;23:69-78.
166. Yavin E, Stemp ED, Weiner L, Sagi I, Arad-Yellin R, Shanzer A: Direct photo-induced DNA strand scission by a ruthenium bipyridyl complex. *J Inorg Biochem* 2004;98:1750-1756.
167. Gicquel E, Paillous N, Vicendo P: Mechanism of DNA damage photosensitized by trisbipyrazyl ruthenium complex. Unusual role of Cu/Zn superoxide dismutase. *Photochem Photobiol* 2000;72:583-589.
168. Vicendo P, Mouysset S, Paillous N: Comparative study of Ru(bpz)3(2+) Ru(bipy)3(2+) and Ru(bpz)2Cl2 as photosensitizers of DNA cleavage and adduct formation. *Photochem Photobiol* 1997;65:647-655.
169. Piccioli F, Sabatini S, Messori L, Orioli P, Hartinger Ch G, Keppler BK: A comparative study of adduct formation between the anticancer ruthenium(III) compound HInd trans-[RuCl4(Ind)2] and serum proteins. *J Inorg Biochem* 2004;98:1135-1142.
170. Aloyz R, Xu ZY, Bello V, Bergeron J, Han FY, Yan Y, Malapetsa A, Alaoui-Jamali MA, Duncan AM, Panasci L: Regulation of cisplatin resistance and homologous recombinational repair by the TFIIH subunit XPD. *Cancer Res* 2002;62:5457-5462.
171. Zdraveski ZZ, Mello JA, Marinus MG, Essigmann JM: Multiple pathways of recombination define cellular responses to cisplatin. *Chem Biol* 2000;7:39-50.
172. Zaludova R, Zakovska A, Kasparkova J, Balcarova Z, Kleinwachter V, Vrana O, Farrell N, Brabec V: DNA interactions of bifunctional dinuclear platinum(II) antitumor agents. *Eur J Biochem* 1997;246:508-517.
173. Farrell N, Appleton TG, Qu Y, Roberts JD, Fontes AP, Skov KA, Wu P, Zou Y: Effects of geometric isomerism and ligand substitution in bifunctional dinuclear platinum complexes on binding properties and conformational changes in DNA. *Biochemistry* 1995;34:15480-15486.
174. Schuhmann E, Altman J, Karaghiosoff K, Beck W: *Bis*[platinum(II)] and *bis*[palladium(II)] complexes of α,ω -dicarboxylic acid *bis*(1,2,4-triaminobutane- N^4) amides. *Inorg. Chem.* 1995;34:2316-2322.
175. Manley JL, Fire A, Cano A, Sharp PA, Gefter ML: DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980;77:3855-3859.
176. Chen D, Brooks CL, Gu W: ARF-BP1 as a potential therapeutic target. *Br J Cancer* 2006;94:1555-1558.
177. Gu J, Ren K, Dubner R, Iadarola MJ: Cloning of a DNA binding protein that is a tyrosine kinase substrate and recognizes an upstream initiator-like sequence in the promoter of the preprodynorphin gene. *Brain Res Mol Brain Res* 1994;24:77-88.
178. Chen D, Kon N, Li M, Zhang W, Qin J, Gu W: ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor. *Cell* 2005;121:1071-1083.
179. Zhong Q, Gao W, Du F, Wang X: Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis. *Cell* 2005;121:1085-1095.
180. Adhikary S, Marinoni F, Hock A, Hulleman E, Popov N, Beier R, Bernard S, Quarto M, Capra M, Goettig S, Kogel U, Scheffner M, Helin K, Eilers M: The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation. *Cell* 2005;123:409-421.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dieter Oesterhelt, der es mir ermöglicht hat, in seiner Abteilung im Max-Planck-Institut für Biochemie meine Arbeit durchzuführen. Seine fortwährende und überaus großzügige Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Bernhard Keppler danke ich sehr für die Bereitstellung der Platin(II)-Biphosphonat-, der Platin(II)-Ringschluss-, der cis/trans- und der Ruthenium-Komplexe. Sein persönliches Engagement, seine Unterstützung und Großzügigkeit haben diese Arbeit bereichert und ermöglicht. Seinen Mitarbeitern Dr. Markus Galanski, Dr. Michael Jakupec und Dr. Christian Hartinger danke ich für die wissenschaftlichen Diskussionen und für die fruchtbare und sehr gute Zusammenarbeit. Herrn Dr. Christian Hartinger gilt für die Platinmessungen mit der ICP-MS mein besonderer Dank.

Meinem Mann Prof. Haralabos Zorbas danke ich für die interessante Aufgabenstellung, seine Geduld mit der Unwissenheit eines Pharmazeuten, was das molekularbiologische Arbeiten angeht, und natürlich für die außergewöhnlich gute Betreuung. Ich möchte mich dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, einen Einblick in die Wissenschaft zu erlangen. Mit seiner Begeisterungsfähigkeit und seinem unerschütterlichen Optimismus hat er bei mir auch in schwierigen Situationen die Begeisterung für die Wissenschaft aufrechterhalten können. Mit seinem erstaunlich großen Wissen, hat er mir auch fachlich viel auf diesem Weg mitgeben können. Ich möchte die wissenschaftlichen Diskussionen, die einen die Zeit vergessen lassen, nicht mehr missen.

Herrn Prof. Wolfgang Steglich danke ich für die Bereitstellung eines Labors in den ersten 5 Monaten meiner Doktorarbeit für die Synthese der Bisamid-bisplatin(II) Verbindung. Hier gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Markus Heinrich für die Betreuung während dieser Zeit und für die Hilfestellung bei der Auswertung der analytischen Daten.

Herrn Dr. Frank Siedler, Beatrix Scheffer, Kostas Konstantinidis und Dr. Michalis Aivaliotis danke ich für die Hilfe bei der massenspektrometrischen Analyse und bei der Auswertung der Ergebnisse.

Dr. Stefan Wild danke ich für die Einführung in die hier bearbeitete Problematik und die im Vorfeld zu dieser Arbeit geführten Diskussionen und Anregungen.

Meinen Kollegen in der Abteilung Prof. Oesterhelt danke ich für die stete Hilfsbereitschaft und das überaus nette Arbeitsklima. Meiner „Teegruppe“ Wilfried Staudinger, Stefan Streif und Matthias Koch danke ich für die abwechslungsreichen Gespräche und für diverse „Tauschgeschäfte“. Peter Reichelt, Katrin Krzak und Anna LeBris danke ich für die tolle und problemlose „Nachbarschaft“ im Labor.

Meinen Bachelor-Studentinnen Monika Schell und Stefanie Raith, meinen Praktikanten Markus Schwarzländer, Thomas Weiss, Daniel Weise, Carolin Hieber und Ulrike Resenberger danke ich für ihre sehr gute Mitarbeit im Labor. Sie waren alle eine persönliche Bereicherung für mich.

Auch meiner deutschen und griechischen Familie sei gedankt, die mich während der Zeit dieser Doktorarbeit unterstützt, motiviert und aufgebaut hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Zorbas-Seifried
Vorname: Stefanie
Wohnort: Klenzestr. 93
80469 München
Geburtsdatum: 04.04.1974
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: verheiratet
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung und berufliche Tätigkeit:

1984-1988	Gymnasium Neckargemünd
1988-1993	Gymnasium Olching; Abschluss: Allgemeines Abitur
1993-1996	Berufsausbildung zur Pharmazeutisch Technischen Assistentin in München, inkl. Apothekenpraktikum 9/1995-2/1996 Löwen-Apotheke, Olching
1996-2001	Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München 9/1998: Abschluss 1. Staatsexamen 4/2001: Abschluss 2. Staatsexamen
5/2001-5/2002	Pharmaziepraktikum 5/2001-10/2001: Aufenthalt in Gainesville, FL, USA; University of Florida, Department of Pharmaceutics 11/2001-5/2002: Praktikum in der Isar-Apotheke, München
6/2002	Abschluss 3. Staatsexamen
8/2002	Approbation zur Apothekerin
8/2002-10/2002	Tätigkeit als Apothekerin in der Isar-Apotheke, München
ab 10/2002	Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für Biochemie Martinsried, Abt. Prof. D. Oesterhelt, im Gastlabor von Prof. H. Zorbas